



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química

RENATA MARIA ARAÚJO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE TERPENOS COMO SOLVENTES NO PROCESSO DE
EXTRAÇÃO DA CERA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

CAMPINAS
2018

RENATA MARIA ARAÚJO DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DE TERPENOS COMO SOLVENTES NO PROCESSO DE
EXTRAÇÃO DA CERA DE CANA-DE-AÇÚCAR

*Dissertação de mestrado apresentada
à Faculdade de Engenharia Química
da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de
Mestra em Engenharia Química.*

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Fazzio Martins Martinez

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA RENATA MARIA
ARAÚJO DE OLIVEIRA E ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
PATRÍCIA FAZZIO MARTINS MARTINEZ.

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2015/25384-1

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

Oliveira, Renata Maria Araújo de, 1993-
OL4a Avaliação de terpenos como solventes no processo de extração da cera de cana-de-açúcar / Renata Maria Araújo de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Patricia Fazzio Martins Martinez.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Cera de cana-de-açúcar. 2. Extração por solventes. 3. Terpenos. 4. Policosanol. I. Martinez, Patricia Fazzio Martins, 1978-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Terpenes evaluation for sugarcane wax extraction

Palavras-chave em inglês:

Sugarcane wax

Extraction by solvents

Terpenes

Policosanol

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Patricia Fazzio Martins Martinez [Orientador]

Andrea Komesu

Ana Maria Frattini Fileti

Data de defesa: 30-07-2018

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada dia 30 de julho de 2018 pela banca
examinadora constituída pelas doutoras*:

Profa. Dra. Patrícia Fazzio Martins Martinez
Faculdade de Engenharia Química/Unicamp

Profa. Dra. Ana Maria Frattini Fileti
Faculdade de Engenharia Química/Unicamp

Profa. Dra. Andrea Komesu
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

*a Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos meus pais e irmãos por todo suporte, incentivo e amor, nos momentos fáceis e difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser tão presente em minha vida. Sempre me guiando nas dificuldades e proporcionando oportunidades com as quais eu nem sonhava.

Aos meus pais Antonio e Gisele, e aos meus irmãos Natalia e João, por todo apoio e amor dedicados a mim em todos estes anos de estudo e aprimoramento. Mesmo quando pareceu impossível, foram vocês que me deram forças. Foi por vocês.

Aos meus tios Cristina e Marcelo e ao meu primo Samuel, por toda ajuda e por se orgulharem de todas as minhas conquistas como se fossem deles próprios.

À minha orientadora, Professora Doutora Patrícia, pela oportunidade incrível e por todos os ensinamentos. Muitas barreiras foram superadas e tenho certeza que pudemos crescer imensamente juntas.

Aos meus queridos amigos Thatianne, Rafael, Jordy e Julcelly por tornarem esta experiência muito mais fácil (ou menos difícil haha). Sem vocês eu não teria conseguido.

Ao meu grupo mais precioso: Julcelly, Filipe, Rafael e Fernanda. E quem diria que a “meia da meia” seria o começo disso tudo? Companheiros de almoço, de jantares e de vida. Que venham muitos anos mais!

À todos aqueles que, de maneiras diferentes e especiais, fizeram a diferença nessa estadia em Campinas. Michelli, Natalia, Nelly, Juliane, Mari, Lucas, Letícia e Carla, obrigada!

Ao Pedro por ter me incentivado a seguir este caminho.

Ao LEF e à professora Doutora Mariana Conceição da Costa por toda disposição e ajuda na conclusão deste trabalho.

Ao professor Doutor Leandro Hantao e ao projeto 2015/05059-9 da FAPESP pela execução das análises de cromatografia.

À empresa Cutrale por ceder o solvente limoneno utilizado neste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo projeto 2015/25384-1 e ao Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e Extensão (FAEPEX/PRP/UNICAMP) processo 99/16.

RESUMO

A extração de materiais lipídicos, como as ceras, é comumente realizada utilizando hexano como solvente extrator. Entretanto, este solvente está vinculado à emissão de compostos orgânicos voláteis (VOCs), poluição do ar e é tóxico. Preocupações em garantir o desenvolvimento sustentável da humanidade têm levado à substituição de solventes tóxicos pelos obtidos a partir de fontes renováveis, menos tóxicos e sustentáveis, como é o caso dos solventes terpênicos. Portanto, neste trabalho, foi estudada a extração de cera a partir da casca da cana-de-açúcar utilizando os terpenos pineno e limoneno. Esta cera possui grande quantidade de octacosanol, principal composto do Policosanol, que é uma mistura de álcoois graxos que apresenta propriedades antiolesterolêmicas. As ceras foram extraídas em Soxhlet e, posteriormente, purificadas. Os extratos obtidos foram caracterizados quimicamente utilizando infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), índice de acidez (IA), índice de saponificação (IS) e cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC), enquanto a caracterização térmica foi realizada por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TGA). Os rendimentos de cera bruta para as extrações com o limoneno e pineno apresentaram valores maiores (18,0-64,4 %) que os do hexano (7,2-8,3 %) devido à reações indesejadas por exposição à luz e temperatura. Porém, após o processo de purificação, observou-se que apesar do hexano extrair mais cera purificada em tempos menores (64,1-83,3 %), os solventes terpênicos também apresentam altos rendimentos relativos (31,2-74,6 %). A análise de teor de octacosanol por GC×GC apontou que a extração deste composto utilizando o hexano diminui conforme o tempo de extração (31,3-22,2 %) devido à extração conjunta de outros compostos. O comportamento inverso foi observado para os solventes terpênicos (17,8-27,8 %), que fazem a extração de forma mais gradual e diretamente proporcional ao tempo. TGA e DSC mostraram que as ceras purificadas obtidas com todos os solventes são estáveis até pelo menos 200 °C e que estes valores indicam boa resistência termooxidativa. Sendo assim, concluiu-se que é possível usar os terpenos limoneno e pineno para a extração de ceras com características físico-químicas similares às disponíveis comercialmente.

ABSTRACT

Lipid materials extraction, such as waxes, is usually performed using hexane as the extracting solvent. However, this solvent is linked to the emission of volatile organic compounds (VOCs), risk of explosion, toxicity and air pollution. Concerns about ensuring the sustainable development of mankind have led to the replacement of toxic solvents from petroleum by those obtained from renewable, less toxic and sustainable sources, such as terpenic solvents. Therefore, in this work, the extraction of wax from sugarcane peels using the terpenes pinene and limonene was studied. This wax contains a large amount of octacosanol, the main compound of Policosanol, which is a mixture of fatty alcohols with anticholesterolemic properties. The waxes were extracted in Soxhlet and subsequently purified. The extracts were chemically characterized using Fourier Transform Infrared (FT-IR) and by comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) while thermal characterization was performed by differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry analysis (TGA). The crude wax yields for extractions with limonene and pinene (18.0-64.4 %) showed results much higher than those of hexane (7.2-8.3 %) due to possible parallel reactions promoted by light and temperature exposure. However, after the purification process, it was observed that although hexane extracts more wax in less time (64.1-83.3 %), the terpene solvents can overcome it with when extraction times are increased (31.2-74.6 %). Analysis of octacosanol content by GC×GC showed that the extraction of this compound using hexane decreases as the extraction time increases (31.3-22.2 %) due to the co-extraction of compounds. The opposite behavior was observed for the terpene solvents (17.8-27.8 %), which extract waxes gradually and directly proportional to the extraction time. Thermal characterizations obtained by TGA and DSC showed that all the sugarcane purified waxes obtained are stable up to at least 200 °C and that these values show good thermo-oxidative resistance. Thus, it has been found that it is possible to use the terpenes limonene and pinene in the extraction of waxes, since the obtained waxes have physicochemical characteristics similar to those waxes available commercially.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma dos tipos de ceras e suas classificações.....	23
Figura 2. Estrutura química do <i>d</i> -limoneno	36
Figura 3. Estrutura química do (a) α -pineno e (b) β -pineno.....	37
Figura 4. Esquema de um extrator Soxhlet.	48
Figura 5. Cartucho posicionado na câmara do extrator Soxhlet.....	48
Figura 6. (a) Histograma da frequência (%) e diâmetro médio das partículas e (b) frequência acumulada das partículas passantes da casca de cana-de-açúcar	60
Figura 7. (a) Histograma da frequência (%) e diâmetro médio das partículas e (b) frequência acumulada das partículas passantes da torta de fitro de cana-de-açúcar	61
Figura 8. Cromatogramas do (a) padrão de limoneno e do (b) limoneno (solvente) utilizado nas extrações.....	63
Figura 9. Cromatogramas das amostras de (a) terebentina comercial, (b) destilada, (c) o resíduo da destilação e (d) padrões de α -pineno e β -pineno	65
Figura 10. Amostras de (a) terebentina comercial, (b) resíduo da destilação e (c) terebentina destilada.	66
Figura 11. Teste de tempo de secagem para extração realizada com limoneno.	67
Figura 12. Acompanhamento da secagem do extrato obtido com limoneno em função do tempo.....	67
Figura 13. Acompanhamento da secagem do extrato obtido com hexano em função do tempo.	68
Figura 14. Cera bruta da cana-de-açúcar extraída com (a) hexano, (b) limoneno e (c) pineno antes e após moagem	69
Figura 15. Extrato de limoneno obtido (a) após extração realizada a frio e (b) após extração em Soxhlet.....	72
Figura 16. Ceras purificadas de (a) hexano, (b) limoneno e (c) pineno.....	73
Figura 17. Captura panorâmica (aumento 50x) da casca após 0,5 h de extração com (a) hexano, (b) limoneno, (c) pineno e (d) <i>in natura</i>	75
Figura 18. Captura (aumento 1000x) da casca após 0,5 h de extração com (a) hexano, (b) limoneno, (c) pineno e (d) <i>in natura</i>	76

Figura 19. Captura (aumento 2500x) da casca após 0,5 h de extração com (a) hexano, (b) limoneno, (c) pineno e (d) <i>in natura</i>	76
Figura 20. Captura (aumento 5000x) da casca após 0,5 h de extração com (a) hexano, (b) limoneno, (c) pineno e (d) <i>in natura</i>	77
Figura 21. Espectros de absorção no infravermelho obtidos das análises da cera de carnaúba (CECAR), da cera de candelila (CECAN) da cera de cana-de-açúcar purificada extraída com hexano por 0,5 h (CEHEX).....	79
Figura 22. Espectros de absorção no infravermelho obtidos da (a) CEHEX, (b) CELIM e (c) CEPIN brutas e purificadas para 0,5 h de extração	81
Figura 23. Cromatograma dos padrões de álcoois graxos Lesstanol 60, em que: A: padrão interno eicosanol (C20:0); B: tetracosanol (C24:0); C: hexacosanol (C26:0); D: octacosanol (C28:0) e E: triacontanol (C30:0).	82
Figura 24. Cromatogramas GCxGC obtidos para as ceras de cana-de-açúcar extraídas por 0,5 h com (a) hexano, (b) limoneno e (c) pineno, em que: A: padrão interno eicosanol (C20:0); B: octacosanol (28:0); C: octacosanoico (C28:0) e D: triacontanoico (C30:0).	83
Figura 25. Cromatogramas GCxGC obtidos para as ceras de cana-de-açúcar extraídas por 0,5 h com (a) hexano, (b) limoneno e (c) pineno apresentados em três dimensões.....	84
Figura 26. Espectro de massas do (a) ácido octacosanoico e (b) ácido triacontanoico	85
Figura 27. Razão entre área de ácido octacosanoico e octacosanol nas amostras de cera-de-açúcar	86
Figura 28. Curva de calibração utilizada para quantificação de octacosanol nas amostras de cera de cana-de-açúcar. Equação: $y = 2,4472 x + 0,8385$ ($R^2 = 0,9981$)	86
Figura 29. Termogramas de (a) fusão e (b) cristalização das ceras-padrão (—) CECAR, (- - -) CECAN e (.....) CEHEX Purificada extraída por 0,5 h.....	90
Figura 30. Termogramas de (a) fusão e (b) cristalização das CEHEX (—) bruta e (- - -) purificada extraídas por 0,5 h	92
Figura 31. Termogramas de (a) fusão e (b) cristalização das CELIM (—) bruta e (- - -) purificada extraídas por 0,5 h	93

Figura 32. Termogramas de (a) fusão e (b) cristalização das CEPIN (—) bruta e (---) purificada extraídas por 0,5 h	94
Figura 33. Termograma das ceras-padrão (—) CECAN, (---) CECAR e (.....) CEHEX purificada	95
Figura 34. Termograma das ceras (a) CEHEX, (b) CELIM e (c) CEPIN brutas e purificadas.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes encontrados nas ceras de superfícies de vegetais	25
Tabela 2. Composição das ceras de abelha de diferentes origens	26
Tabela 3. Composição típica de torta de filtro de cana-de-açúcar	30
Tabela 4. Propriedades do hexano, do limoneno e do α -pineno	38
Tabela 5. Valores de KB para diversos solventes.	38
Tabela 6. Parâmetros de Hansen para alguns solventes	39
Tabela 7. Resultados para ensaios de umidade e teor total de lipídios nas matérias-primas	62
Tabela 8. Análise composicional (%) da terebentina comercial, destilada e do resíduo da destilação	64
Tabela 9. Rendimentos de cera bruta (R_{cb}) por tempo de extração com hexano, limoneno e pineno	70
Tabela 10. Rendimentos de cera bruta (R_{cb}) obtidos nas extrações a frio com limoneno por 24 h.....	71
Tabela 11. Rendimentos das ceras de cana-de-açúcar purificadas (R_{cp})	73
Tabela 12. Rendimentos relativos ao teor de lipídios totais (RR) das ceras de cana-de-açúcar extraídas com hexano, limoneno e pineno	74
Tabela 13. Grupos funcionais do espectro pelos números de onda das bandas.	78
Tabela 14. Teor de octacosanol nas amostras de cera purificada	87
Tabela 15. Resultados dos índices de acidez e saponificação para as ceras de cana-de-açúcar extraídas com hexano (CEHEX), limoneno (CELIM) e pineno (CEPIN) por 0,5 h	89
Tabela 16. Temperaturas e entalpias de fusão e cristalização das ceras, obtidas por DSC.....	92

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ASTM – *American Society for Testing and Materials*

ATR – Reflectância Total Atenuada

CECAN – Cera de candelila

CECAR – Cera de carnaúba

CEHEX – Cera de cana-de-açúcar extraída com hexano

CELIM – Cera de cana-de-açúcar extraída com limoneno

CEPIN – Cera de cana-de-açúcar extraída com pineno

CG – Cromatografia Gasosa

CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

CTBE – Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial

FEQ – Faculdade de Engenharia Química

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FT-IR – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

GCxGC – Cromatografia Bidimensional Abrangente

HCl – Ácido Clorídrico

IA – Índice de Acidez

IS – Índice de saponificação

KB – Kauri-Butanol

KOH – Hidróxido de Potássio

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

NaOH – Hidróxido de Sódio

P.A. – Para análise

P.E. – Ponto de Ebulição

TGA – Análise Termogravimétrica

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. OBJETIVO GERAL	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1. CERAS.....	23
3.1.1. Definição e características.....	23
3.1.2. Propriedades e aplicações de ceras naturais	25
3.2. CANA-DE-AÇÚCAR.....	29
3.3. CERA DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	30
3.3.1. Extração e purificação da cera de cana-de-açúcar.....	32
3.3.2. Solventes: hexano, limoneno e pineno	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. MATERIAL	41
4.1.1. Matéria-prima.....	41
4.1.2. Solventes.....	41
4.1.3. Reagentes e insumos de processo.....	42
4.2. MÉTODOS.....	42
4.2.1. Preparação e caracterização das matérias-primas.....	42
4.2.1.1. Análise granulométrica (classificação das partículas)	43
4.2.1.2. Análise de umidade e teor total de lipídios das matérias-primas	44
4.2.2. Destilação da terebentina e caracterização dos solventes	45
4.2.3. Desenvolvimento do método de extração e secagem das amostras.....	46
4.2.3.1. Teste de tempo de secagem na estufa para os solventes terpênicos.....	47

4.2.4.	Extração da cera bruta de cana-de-açúcar com hexano, limoneno e pineno.....	47
4.2.5.	Extração a frio e extração sem cartucho	50
4.2.6.	Purificação da cera de cana-de-açúcar	50
4.2.7.	Caracterização morfológica da matéria-prima antes e após a extração por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	52
4.2.8.	Caracterização química das ceras brutas e purificadas extraídas com hexano, limoneno e pineno	52
4.2.8.1.	Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	53
4.2.8.2.	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente com detector por ionização de chamas/espectrometria de massas (GCxGC-FID/MS).....	53
4.2.8.3.	Índice de Acidez (IA)	55
4.2.8.4.	Índice de Saponificação (IS)	56
4.2.9.	Caracterização térmica das amostras brutas e purificadas extraídas com hexano, limoneno e pineno	57
4.2.9.1.	Análise por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	57
4.2.9.2.	Análise Termogravimétrica (TGA)	58
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
5.1.	CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS.....	59
5.1.1.	Análise granulométrica	60
5.1.2.	Análise da umidade e teor total de lipídios	62
5.2.	CARACTERIZAÇÃO DOS SOLVENTES (LIMONENO E PINENO).....	63
5.3.	TESTE PARA DEFINIÇÃO DO TEMPO DE SECAGEM PARA OS SOLVENTES TERPÊNICOS E PARA O HEXANO	66
5.4.	EXTRAÇÃO DA CERA BRUTA COM HEXANO, LIMONENO E PINENO ...	68
5.4.1.	Purificação da cera bruta	72

5.5. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA MATÉRIA-PRIMA ANTES E APÓS AS EXTRAÇÕES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	74
5.6. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS CERAS EXTRAÍDAS COM HEXANO, LIMONENO E PINENO	77
5.6.1. Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR).....	77
5.6.2. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente com detector por ionização de chamas/espectrometria de massas (GCxGC-FID/MS)	82
5.6.3. Índices de acidez e saponificação	88
5.7. CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DAS AMOSTRAS EXTRAÍDAS COM HEXANO, LIMONENO E PINENO.....	89
5.7.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	89
5.7.2. Análise Termogravimétrica	94
6. CONCLUSÕES.....	97
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
ANEXO I – Ésteres metílicos para óleos e gorduras.....	110
APÊNDICE A – Espectros FT-IR das ceras extraídas com hexano (CEHEX), limoneno (CELIM) e pineno (CEPIN) em diferentes tempos	113

1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se atualmente como o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, tendo como projeção para a safra de 2018/2019 a colheita de 625,96 milhões de toneladas desta cultura (UNICA, 2018; CONAB, 2018). A alta produção e o processamento deste material geram uma grande quantidade de resíduos na indústria sucroalcooleira, como a casca da cana-de-açúcar e a torta do filtro rotativo (CONAB, 2018; AGEITEC, 2018). Sendo assim, faz-se necessário estudos de processos que possam agregar valor a estes resíduos, como é o caso da extração de cera em vez de serem utilizados como fertilizantes em campos de cultivo ou para geração de energia em caldeiras.

A cera da cana-de-açúcar é um pó branco ou amarelado depositado majoritariamente na superfície do colmo da planta e que, na indústria, pode estar contida na casca ou na torta de filtro rotativo. No caso da utilização da cana para a produção de álcool e açúcar, a cera é extraída no processamento da cana-de-açúcar durante a moagem, e acaba se misturando com o caldo, que é posteriormente filtrado e da origem à torta de filtro rotativo. Já no caso do processamento da cana para a produção do suco (também conhecido como garapa), a cera permanece na casca que é retirada por raspagem, prática comumente realizada na extração do caldo de cana para fabricação de rapadura, melado e outros produtos alimentícios (GEORGES et al. 2006; INARKAR e LELE, 2012).

As ceras são amplamente utilizadas nas indústrias pelo mundo todo, como em indústrias de adesivos e colas quentes, em que são empregadas para regular a viscosidade do produto ou como lubrificantes e enrijecedora de superfícies. As ceras são igualmente muito aplicadas em indústrias de velas, cerâmicas, cosméticas e alimentícias, como redutoras de ponto de fusão, reguladoras de consistência, conservantes e outras diversas aplicações (COTTOM, 1994; WOLFMEIER, 2005). Para a cera da cana-de-açúcar especificamente tem sido estudadas muitas aplicações dos seus álcoois graxos como fármaco no tratamento de inflamações e também para diminuição das lipoproteínas de baixa densidade (LDL - colesterol ruim) no sangue (MARINANGELI et al., 2010; GNANARAJ, 2012; OU et al., 2012; ATTARD et al., 2015a).

A extração de lipídios, como a cera, é normalmente realizada utilizando solventes como clorofórmio, benzeno, éter de petróleo e, principalmente, o hexano. Por possuir baixo ponto de ebulição, o hexano é um ótimo solvente em extrações utilizando o método Soxhlet, porém, este solvente é classificado como muito perigoso por ser um líquido inflamável e nocivo à saúde, podendo causar danos ao sistema nervoso central e periférico por exposição repetida ou prolongada. Além disso, o hexano é uma fração parafínica do petróleo, sendo, portanto, proveniente de uma fonte não renovável, o que torna sua utilização cada vez mais inapropriada dentro do contexto de desenvolvimento sustentável (CHEMAT et al., 2012a; SICAIRE et al., 2015; FISPQ hexano, 2017; ATTARD et al., 2018).

Alternativas aos solventes provenientes de fontes fósseis são os solventes de fontes renováveis, chamados de solventes verdes ou biosolventes, como os terpenos. Dentre os terpenos de maior interesse estão o pineno e o limoneno, devido à elevada quantidade em que são produzidos. Eles são obtidos como coprodutos nas indústrias de papel e celulose e suco de laranja, respectivamente (CHEMAT et al., 2012a; TANZI et al., 2012).

O limoneno é um composto extraído principalmente do processamento da laranja para obtenção de suco e é usado para limpeza na indústria por seu poder desengordurante, como essência na indústria de cosméticos, dentre outras aplicações (MAMIDIPALLY e LIU, 2004; LIU e MAMIDIPALLY, 2005). Já o pineno, proveniente de pinhos, é a fração mais leve da destilação da resina extraída pela indústria de celulose e é utilizado como solvente para tintas, também conhecido como essência de terebentina e aguarrás. Estes terpenos têm sido estudados como solventes substitutos na extração de óleos, mas até o momento não foram encontrados na literatura trabalhos que utilizassem os solventes terpênicos para a extração de ceras (CHEMAT et al., 2012b; BERTOUCHE et al., 2013; BOUTEKEDJIRET et al., 2014).

Sendo assim, estes solventes terpênicos tem elevado potencial para extração de lipídios, como a cera, provenientes destes resíduos da indústria sucroalcooleira.

De acordo com o exposto anteriormente, pretende-se encontrar uma alternativa viável em termos práticos e que satisfaça as necessidades atuais de desenvolvimento sustentável e proteção do meio ambiente, substituindo o hexano como solvente na extração de cera da cana-de-açúcar pelos terpenos limoneno e pineno, promovendo, também, a valorização de resíduos subjugados da indústria sucroalcooleira. Esta cera extraída também possui aplicações como suplemento alimentar, o que torna a utilização de solventes verdes ainda mais interessante.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a utilização de solventes terpênicos (pineno e limoneno) como substitutos ao hexano no processo de extração de cera a partir da casca da cana-de-açúcar e da torta do filtro rotativo, resíduos gerados durante a produção de garapa, e de açúcar e álcool, respectivamente.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar as matérias-primas (casca e torta de filtro rotativo de cana-de-açúcar) utilizando moinho de martelos para homogeneização e diminuição das partículas grandes e secá-las para extração e armazenagem;
- Caracterizar as matérias primas (casca e torta de filtro rotativo de cana-de-açúcar) utilizando análise de umidade, análise granulométrica e extração total de lipídios;
- Extrair a cera bruta utilizando o pineno, o limoneno e o hexano (solvente padrão) como solventes extratores em diferentes tempos para verificação da influência desta variável de processo;
- Purificar a cera bruta por cristalização em hexano, utilizando acetona para lavagem;
- Avaliar a performance dos solventes terpênicos em relação aos rendimentos de cera bruta (massa de cera/massa biomassa), cera purificada (massa de cera purificada/massa de cera bruta) e rendimento relativo em função do teor total de lipídios (massa de cera/massa de lipídios totais);
- Caracterizar quimicamente as ceras utilizando Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), índice de acidez (IA), índice de saponificação (IS) e por cromatografia gasosa (CG);

- Caracterizar termicamente as ceras obtidas por análise de termogravimetria (TGA) e por calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Comparar as ceras obtidas com as ceras comerciais de carnaúba e candelila conforme suas características físico-químicas (índice de acidez, índice de saponificação, resistência termo-oxidativa, pontos de fusão e cristalização e suas respectivas entalpias).
- Avaliar a seletividade dos compostos terpênicos com relação a extração do ácido graxo octacosanol.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

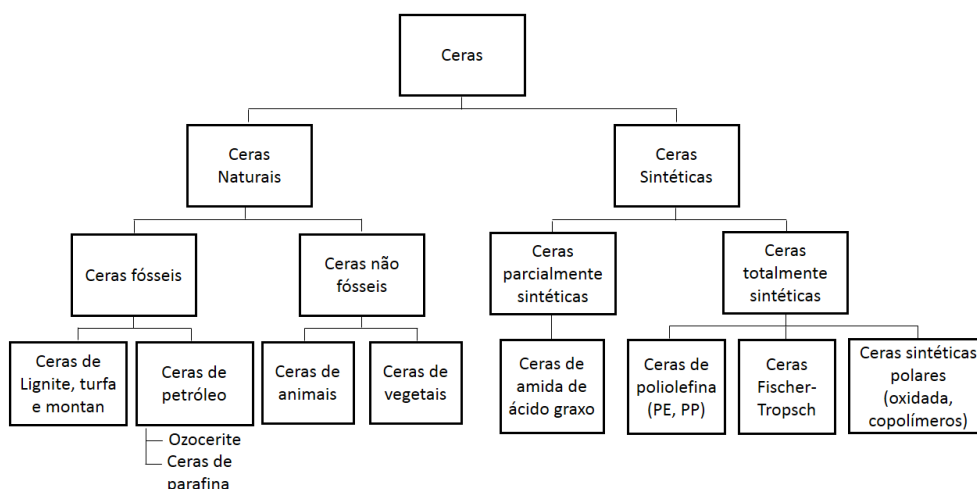
3.1. CERAS

3.1.1. Definição e características

As ceras são uma mistura de compostos líquidos ou sólidos e que podem ser de origem vegetal, animal ou mineral. Elas são uma mistura complexa de compostos apolares de cadeia longa, sendo comumente definidas como ésteres feitos de ácidos graxos de cadeia longa com álcoois graxos de cadeia longa. Esta definição, porém, sofreu muitas modificações devido à complexidade desta mistura. Elas podem ser classificadas em três categorias: sintéticas, semissintéticas e naturais (WOLFMEIER, 2005; ENDLEIN e PELEIKIS, 2011; HWANG et al., 2012).

As ceras semissintéticas são as ceras naturais que passam por algum tipo de reação química que possibilite o seu uso, como reação de esterificação, por exemplo. Já as ceras totalmente sintéticas só foram desenvolvidas no século XX e são divididas em ceras Fischer-Tropsch e poliolefina (ceras de polietileno e polipropileno). As ceras naturais são as de origem vegetal ou animal que são utilizadas *in natura*, sendo, estas, as ceras de interesse neste trabalho. A Figura 1 é um fluxograma que mostra os tipos de cera e suas classificações (WOLFMEIER, 2005).

Figura 1. Fluxograma dos tipos de ceras e suas classificações.



Nota: PE (polietileno) e PP (polipropileno).
Fonte: Adaptado de WOLFMEIER, 2005.

As ceras consideradas naturais são aquelas formadas por processos bioquímicos e que são produzidas através do metabolismo de plantas e animais. As ceras naturais obtidas de processos geológicos acontecidos há muito tempo são chamadas de ceras fósseis e dentro desta categoria estão as ceras provenientes do petróleo, lignito e turfa. As ceras provenientes do petróleo são, geralmente, apolares, enquanto as ceras de lignito e turfa contêm compostos oxigenados. A síntese biológica das ceras também acontece na natureza em plantas como a palma de carnaúba, em animais como a ovelha e em insetos como as abelhas (WOLFMEIER, 2005; STRÁNSKÝ et al., 2006).

Dentre as ceras animais está a de abelha, que varia de cor entre o branco e amarelo e já é conhecida há mais de dois mil anos, sendo a única referência de cera existente antes do século XIX. Ela é secretada pelas abelhas e utilizada na construção das colmeias, sendo obtida pelo homem como subproduto da extração do mel e é grandemente utilizada na indústria de cosméticos, de velas e pelos próprios apicultores para construção de colmeias sintéticas. Outra cera animal muito utilizada é a lanolina, proveniente da lã de ovelhas, que é muito utilizada como cosmético hidratante (COTTOM, 1994; SCHMIDT, 2005).

As ceras de origem vegetal estão presentes em praticamente todas as plantas, agindo para afastar patógenos, controlar a respiração e impedir a perda de água para o ambiente. Na Tabela 1 são apresentados os principais componentes das ceras de vegetais (PARISH e GRAINGER, 2017; CHRISTIE, 2017). Esta tabela mostra que além dos álcoois e ácidos graxos as ceras de superfícies vegetais também apresentam diversos outros componentes como alcanos, aldeídos, cetonas etc.

Ceras como a de carnaúba (*Copernicia prunifera*; *Copernicia cerifera*), ouricouri (*Syagrus coronata*, *Cocos coronata*) e candelila (*Euphorbia cerifera*, *E. antisiphilitica*) são os exemplos mais típicos de ceras vegetais, porém existem ainda a cera do Japão, do farelo de arroz, da cana-de-açúcar, de jojoba, de mamona, de myrica e muitas outras (COTTOM, 1994). De acordo com GANDRA (2006), as ceras de carnaúba, candelila e a de abelha são as mais importantes, técnica e industrialmente falando, pois já foram muito estudadas e estão totalmente

consolidadas no mercado. Outro tipo de cera também muito utilizada são as minerais, provenientes do petróleo, mais conhecidas como parafinas.

Tabela 1. Componentes encontrados nas ceras de superfícies de vegetais

Componente	Estrutura	
n-alcanos	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CH}_3$	21 a 35C – número ímpar
Alquil ésteres	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{COO}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$	34 a 62C – número par
Ácidos graxos	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{COOH}$	16 a 32C – número par
Álcoois graxos (primários)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_y\text{CH}_2\text{OH}$	22 a 32C – número par
Aldeídos	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_y\text{CHO}$	22 a 32C – número par
Cetonas	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CO}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$	23 a 33C – número ímpar
Álcoois graxos (secundários)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{CHOH}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$	23 a 33C – número ímpar
β-dicetonas	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x\text{COCH}_2\text{CO}(\text{CH}_2)_y\text{CH}_3$	27 a 33C – número ímpar
Triterpenoides	Esteróis, alpha-amirina, beta-amirina, uvaol, eritrodiol	
Ácidos triterpenoicos	Ácido ursólico, ácido oleanoico etc.	

Fonte: Adaptado de CHRISTIE (2017).

3.1.2. Propriedades e aplicações de ceras naturais

Muitas ceras sintéticas foram desenvolvidas através dos anos, porém nunca conseguiram substituir completamente suas equivalentes naturais, que possuem menor custo de fabricação e, portanto, menor preço de venda. (COTTOM, 1994; WOLFMEIER, 2004).

Uma cera muito utilizada na indústria é a cera de abelha. As abelhas secretam a cera para a formação da colmeia e o homem a obtém como subproduto na extração do mel. Os países africanos como Tunísia, Marrocos, Quênia, Tanzânia, dentre outros, são os maiores fornecedores desta cera da abelha africanizada (*Apis mellifera*) ao lado da China. Esta cera também possui grande quantidade de ésteres de cera, principalmente os ésteres cujos ácidos graxos são o palmítico e o esteárico. A cera excretada pelas abelhas é branca, mas a coloração final – geralmente amarelada – se dá devido à presença de pólen e própolis. Ela pode possuir mais de 300 componentes, sendo o seu ponto de ebulição entre 61,5 e 65,0 °C e apresenta características de insolubilidade em água, solubilidade parcial em éter e total em benzeno, clorofórmio e terebentina. Na Tabela 2 observa-se a composição da cera

de abelha de diferentes origens. A cera *in natura* é principalmente utilizada na fabricação de velas – a Igreja Católica Apostólica Romana estipula um mínimo de 10 % desta cera em suas velas – e em artesanatos, enquanto a cera purificada é utilizada em batons, cremes hidratantes, pastas para cabelo e muitos outros cosméticos. Ela também é aplicada na indústria alimentícia e farmacêutica. No entanto, cerca de 40 % da produção mundial é vendida de volta aos apicultores para a produção de colmeias sintéticas (SCHMIDT, 2005; NUNES et al., 2012).

Tabela 2. Composição das ceras de abelha de diferentes origens

Componentes	Brasil	China	Canadá	República Tcheca
Hidrocarbonetos (%)	15	16	14	13
Ácido graxo de cera (%)	14	9	(8)-12	13
Álcoois graxos (%)	1	1	1	-
Palmitatos (%)	20	24	35**	31**
Oleatos (%)	3	5	(4)-8	13
Hidroximonoésteres (%)	12	11	(4)-8	13
Total (%)	65	66	(62)	70

Nota: * Valores em parêntesis foram encontrados apenas em alguns casos. ** Palmitatos e oleatos.

Fonte: Adaptado de COTTOM, 1994.

Já as principais ceras de origem vegetal utilizadas na indústria são a cera da folha de palma da carnaúba e a cera de candelila, tanto pelas suas aplicações quanto do ponto de vista econômico. A cera de carnaúba é retirada das folhas da palmeira *Copernicia prunifera* e foi reportada pela primeira vez em 1648 por PISO, tendo o primeiro estudo de propriedades publicado em 1811 em “*Transactions of the Royal Society*”, em Londres. Já em 1862, cerca de 1280 toneladas da cera já eram exportadas do Brasil. As palmas de carnaúba ocorrem principalmente no Brasil, na região nordeste. Quando a palmeira atinge 8 anos de idade, o rendimento por folha é de 4 a 7 gramas, e a árvore chega a 200 anos. A cera é formada principalmente por ésteres de ceras, possui ponto de fusão de 82 °C, que pode ser considerado alto, e é solúvel a quente na maioria dos solventes apolares, sendo miscível em qualquer proporção desde que em temperatura maior que o ponto de fusão. Esta cera é altamente empregada na produção de ceras polidoras de superfícies como chão, móveis, carros, sapatos e muitas outras. Após alguns tratamentos esta cera também é propícia para a utilização na indústria farmacêutica como esmalte para

pílulas e na indústria de cosméticos em produtos como batons e cremes. Outra indústria que utiliza esta cera em larga escala é a alimentícia, sendo utilizada como aditivo na produção de goma de mascar, por exemplo. Porém, na literatura, encontram-se estudos desta cera como revestimento para frutas, aumentando o tempo de prateleira das mesmas (CHRISTIE, 2017; SCHMIDT, 2005).

A candelila é uma cera também de origem vegetal e é insolúvel em água, mas muito solúvel em acetona, clorofórmio, benzeno e outros solventes orgânicos. Ela é caracterizada como uma cera que possui alta concentração de hidrocarbonetos em sua composição (aproximadamente 50 %) e relativamente baixa quantidade de ésteres voláteis e possui ponto de ebulição entre 68,5 e 72,5 °C. Esta cera é epicuticular e ocorre em plantas da espécie *Euphorbia* e *Pedilanthus*, que são parecidas com arbustos. A extração de cera desta planta ocorre principalmente em estados do México. As principais aplicações desta cera são como produtos de limpeza e polimento, principalmente como cera para sapatos, chão e móveis e na indústria de cosméticos como constituinte de batons (TORO-VAZQUEZ et al., 2007; SAUCEDO-POMPA et al., 2007; SAUCEDO-POMPA et al., 2009).

JACOMINO et al. (2003) realizaram estudos em goiabas em que as mesmas foram revestidas com emulsões de cera de carnaúba em diferentes concentrações e armazenadas em condições ambiente. Foram utilizadas as ceras comerciais Citrosol AK (18 %), Citrosol M (10 %), Fruit Wax (18 a 21 %), Meghwax ECF-100 (30 %) e Cleantex wax (18,5 a 20,5 %), que foram aplicadas manualmente. Frutas sem o revestimento foram mantidas para comparação. A cera aplicada na superfície da fruta cria uma barreira que muda a sua permeabilidade, diminuindo a perda de água da fruta para o ambiente e também mudando as taxas de O₂ e CO₂. As goiabas foram caracterizadas logo após a colheita e 2, 4 e 6 dias após a aplicação das ceras. As conclusões obtidas foram de que a utilização dessas emulsões com cera de carnaúba são uma boa alternativa para aumentar o tempo de prateleira destas frutas tão perecíveis, retardando o amadurecimento, reduzindo a incidência de podridões e perda de massa. A emulsão com maior concentração (Meghwax ECF-100) foi a que obteve o melhor resultado, porém ainda precisa ser avaliada em diferentes concentrações.

Ainda sobre goiabas, RIBEIRO et al. (2005) realizaram um estudo sobre o armazenamento em condição ambiente (27 °C e 70 % de umidade relativa) e sob refrigeração (10 °C e 85 % de umidade relativa) por 12 dias das frutas tratadas com cera de carnaúba. A cera escolhida foi a Premium citrus (12,8 % de sólidos totais) a 0 %, 50 % e 100 % da concentração original. As ceras foram aplicadas nas frutas e armazenadas às condições do estudo. Em termos de perda de massa, observou-se que as frutas refrigeradas tiveram perda bem menor que as frutas armazenadas em condições ambiente, porém as concentrações de 50 % e 100 % praticamente não apresentaram diferenças entre si. A perda de massa nas frutas refrigeradas foi de menos de 5 % durante os 12 dias de estudo, portanto, é dispensável a utilização da cera nestas condições. Porém, para o armazenamento em condições ambiente, a utilização da cera mantém a perda de massa das goiabas em níveis aceitáveis para comercialização por até 8 dias, reduzindo a degradação da clorofila contida nas cascas.

SAUCEDO-POMPA et al. (2009) utilizaram a cera de candelila como matéria-prima de um filme para revestimento de abacates, em busca do aumento do tempo de prateleira. Três concentrações de ácidos elágico foram misturadas à cera para testar se a qualidade do abacate era mantida por mais tempo. Os abacates selecionados foram inoculados com esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*, principais fungos que acometem os abacates. Foi então comprovado que a proliferação destes fungos foi substancialmente diminuída, principalmente pela utilização do ácido elágico como aditivo no filme de cera.

Outra possível fonte de cera vegetal é a cana-de-açúcar. Devido à grande produção e processamento de cana-de-açúcar no mundo, os resíduos também são produzidos em abundância, o que fez esta matéria-prima se tornar fonte de obtenção de cera. Um dos interesses sobre a cera de cana-de-açúcar deve-se à presença do policosanol, uma mistura de álcoois graxos que, após purificação, pode ser usada como fármaco para diminuição do colesterol (LDL), o que agrega alto valor a esta cera (GOUNI-BERTHOLD, 2002). Como a extração desta cera utilizando solventes alternativos é o objetivo do trabalho, o tema será abordado com mais profundidade nos itens a seguir.

3.2. CANA-DE-AÇÚCAR

O cultivo da cana-de-açúcar representa uma importante atividade agrícola, sendo o Brasil o maior produtor desta planta no mundo, bem como o maior exportador de açúcar. Estima-se que para a safra 2018/2019 serão colhidas 625,96 milhões de toneladas de cana (CONAB, 2018).

Associada à cana-de-açúcar está a produção de um combustível sustentável, o etanol ou bioetanol. Como possui característica de combustível “limpo”, o uso da cana deve ser feito de maneira muito consciente para que não haja desperdícios. Estudos comprovaram que a cana-de-açúcar é uma fonte promissora de ácidos fenólicos, flavonoides, fitoesteróis, triterpenoides e outros fitoquímicos (DESHMANE e DEV, 1971; GEORGES et al., 2006; DUARTE-ALMEIDA et al., 2011). Um modo de evitar estes desperdícios dos subprodutos da produção de cana-de-açúcar é utilizá-los para obtenção de materiais de alto valor agregado, como a cera (GRAILLE et al., 2003).

Dentre as etapas no processo de fabricação do álcool está a extração do caldo da cana e sua posterior clarificação, que remove as impurezas solúveis e não solúveis. Estas impurezas são retiradas do processo através de filtros rotativos ou filtros-prensa. A quantidade de cera presente na torta de filtro pode variar de acordo com o tipo de cana, tipo de colheita (manual ou mecânica), idade de corte etc. A torta não processada possui aproximadamente 75 % de água. A Tabela 3 apresenta a composição típica em base seca. A maioria da torta de filtro e outros resíduos da indústria sucroalcooleira – como a casca – são destinados aos campos de cultivo para serem utilizados como fertilizante, principalmente devido ao seu alto teor de nutrientes para o solo principalmente na produção de goiaba, banana, eucalipto, dentre outros (RABELO et al., 2015).

Outro destino para a torta de filtro é a produção de cera bruta, que é o nome dado aos materiais lipídicos da cana. Durante o seu processamento, apenas 40 % desses lipídios são dispersos no caldo da cana, enquanto o material remanescente permanece no bagaço (ASIKIN et al., 2008; QI et al., 2017). Destes 40 % que estão contidos no caldo, cerca de 95 % são concentrados na torta. Esta

cera pode ser uma alternativa a outras ceras vegetais (PATURAU, 1989; LAGUNA et al., 1996; GRAILLE et al., 2003; ATTARD et al., 2015a; RABELO et al., 2015).

Tabela 3. Composição típica de torta de filtro de cana-de-açúcar

	Teor (%)
Lipídios totais	5 - 14
Fibras	15 – 30
Açúcares	5 – 15
Proteína	5 – 15
Cinzas totais	9 – 20
SiO ₂	4 – 10
CaO	1 – 4
P ₂ O ₅	1 – 3
MgO	0,5 – 1,5

Fonte: PATURAU (1989).

Outra possível fonte de cera é a casca da cana-de-açúcar. Como grande parte da cera contida na planta está contida na casca, o resíduo proveniente da raspagem da cana faz dela uma ótima fonte de extração deste composto. A retirada da casca da cana antes do seu processamento, como acontece no caso de obtenção da garapa, mostrou que o processo de extração da cera seria muito mais fácil e limpo utilizando-se essa matéria-prima que não passa por nenhum processamento prévio (INARKAR e LELE, 2012).

A recuperação desta cera é comumente realizada utilizando solventes, e o seu rendimento depende fortemente de fatores como: tipo de solvente utilizado, temperatura, tempo de extração, razão solvente/alimentação e também as características da matéria-prima utilizada, como o tipo de cana, umidade e tamanho da partícula (ATTARD et al. 2015b; VILLAR et al., 2005).

3.3. CERA DA CANA-DE-AÇÚCAR

Apesar da pequena porcentagem de lipídios existentes na cana, a produção dessa planta em larga escala a torna uma grande fonte de ceras do tipo natural (PATURAU, 1989).

O principal álcool graxo na cera é o octacosanol, representando mais de 60 % dos álcoois graxos totais. Fitosteróis também podem estar presentes em quantidades variáveis, sendo o principal componente o β -sitosterol (NUISSIER et al., 2002; VIEIRA, 2003; NUISSIER et al., 2008).

NAZATO et al. (2012) realizaram um estudo da aplicação da cera bruta de cana-de-açúcar como substituinte da vaselina sólida e líquida na produção de brilho labial. As formulações em que a cera bruta de cana-de-açúcar esteve presente foram menos aceitas em termos de brilho e textura, porém mostraram melhor resistência física em temperatura ambiente ao fim da análise sensorial. Concluiu-se que a cera da cana possui grande potencial na aplicação em brilhos labiais e em outros produtos em que a vaselina é utilizada. Outra potencial aplicação cosmética já estudada é utilização dos álcoois graxos em formulações anti-acne (MAJEED et al., 2007).

Apesar de apresentar todas as características físico-químicas de cera, a mistura de compostos lipídicos obtida da cana-de-açúcar tem como principal aplicação a utilização dos seus álcoois graxos como medicamento e suplemento alimentar. Estes álcoois de cadeia longa são conhecidos como Policosanol e têm em sua composição principalmente docosanol (C₂₂), tetracosanol (C₂₄), hexacosanol (C₂₆), octacosanol (C₂₈) e triacontanol (C₃₀) (IRMAK e MILLIGAN, 2006; LUCAS et al., 2007; WEERAWATANAKORN et al., 2017).

Estudos apontam o uso desses álcoois graxos (policosanol) em pesquisas médicas como agentes redutores do “colesterol ruim” no sangue (LDL-C: *low-density lipoprotein cholesterol*), como antioxidantes, como melhoradores das funções sanguíneas, como anti-inflamatórios e muitos outros benefícios (MARINANGELI et al., 2010; ATTARD et al., 2015a; OLIGARO-BOSSO et al., 2009; WANG et al., 2010; OU et al., 2012). Pesquisas sobre a utilização destes álcoois mostraram que não há toxicidade, carcinogenicidade ou mutagenicidade ligados ao uso à longo prazo deste medicamento, podendo o seu uso ser considerado seguro (ALEMAN et al., 1994; GAMEZ et al., 2001; IRMAK e MILLIGAN, 2006).

Porém, até a presente data, ainda não foram encontrados registros de processos em grande escala para a extração da cera no Brasil, apesar de ser o maior produtor de cana-de-açúcar.

3.3.1. Extração e purificação da cera de cana-de-açúcar

Devido às características da cera, como sua composição e insolubilidade em solventes polares, faz-se necessário o uso de solventes apolares na sua extração. O rendimento da extração depende de fatores como o tempo e o método de extração, solvente utilizado, relação solvente/alimentação e o tamanho das partículas (BIRCH, 2007; QI et al., 2017). A extração da cera bruta de cana-de-açúcar é normalmente realizada por extração sólido-líquido em que é utilizada a matéria-prima com umidade menor que 10 % e o solvente é recuperado por evaporação (SLUITER et al., 2005).

PHUKAN e BORUAH (1999) desenvolveram um método para isolar e refinar a cera de cana-de-açúcar extraída da torta de filtro proveniente da indústria de açúcar. A cera bruta foi extraída em sistema de refluxo com ensaios entre 4 e 6 h, utilizando tetracloreto de carbono como solvente. Os rendimentos obtidos variaram entre 3,5 e 4,1 %. A cera microcristalina obtida pelo método desenvolvido foi proposta para ser utilizada como substituinte da cera de carnaúba.

Já NUISSIER et al. (2002) utilizaram o resíduo de fermentação e destilação da cana-de-açúcar para a extração com ciclo-hexano, obtendo rendimento de 7 % em cera bruta. Não foi apresentada a caracterização da cera obtida. O preparo da amostra envolveu a filtração do resíduo de fermentação e destilação sobre terra de “fuller”, secagem a 50 °C e moagem do material. A amostra preparada, com grau de umidade não indicado, foi extraída em equipamento tipo Soxhlet, à temperatura ambiente, durante o período de 20 h.

VIEIRA (2003) utilizou torta de filtro de cana-de-açúcar orgânica e queimada para extração da cera. As extrações foram realizadas com hexano em extrator do tipo Soxhlet de 5 L de capacidade, com cerca de 500 g de torta seca por 8 h, aproximadamente 5 ciclos. Foram obtidos cerca de 32 g de cera bruta da torta de cana orgânica e 20 g de cera bruta da torta de cana queimada. O rendimento em cera purificada foi de 60 % e 57 % para as tortas de cana orgânica e queimada, respectivamente.

GANDRA (2006) estudou a obtenção da cera de cana-de-açúcar e suas frações. Foi extraída a cera da torta de filtro de cana orgânica e mista

(aproximadamente 30 % de cana queimada e 70 % de cana não queimada), com rendimento em cera bruta de 5,9 e 7 %, respectivamente. Foram estudados dois processos de purificação da cera (álcool frio e álcool quente) e posteriormente suas propriedades físico-químicas, térmicas e de composição. Os métodos de purificação geraram ceras com diferentes propriedades, porém todas adequadas para aplicação. Não foram observadas diferenças na qualidade das ceras com relação ao tipo de torta de filtro utilizada.

LUCAS et al. (2007) estudaram as variáveis pressão e temperatura na extração supercrítica de álcoois de cadeia longa da cera de cana-de-açúcar. Devido à complexidade dos métodos de extração com solventes e a toxicidade, geração de resíduos e baixa seletividade dos mesmos, outras técnicas extrativas foram estudadas. Os resultados obtidos indicam que a extração com CO₂ supercrítico é muito mais seletiva aos n-álcoois de cadeia longa. Enquanto a extração realizada com heptano obteve rendimento de cera bruta de 7,80 % e a de CO₂ supercrítico de 2,43 %, a concentração dos álcoois no extrato foi de 22,00 % para o primeiro método e 78,32 % para o segundo, indicando que este tipo de extração foi extremamente eficiente para concentração do Policosanol.

INARKAR e LELE, em 2012, realizaram a extração da cera da casca da cana-de-açúcar com base no método proposto por PHUKAN e BORUAH (1999), porém realizando a extração com tetracloreto de carbono (CCl₄) por 8-10 h. O rendimento obtido foi de 0,95 % em massa de cera obtida por massa de casca utilizada. Este valor é baixo quando comparado ao rendimento da torta de filtro. Entretanto, são muitas as possíveis variáveis que influenciam a quantidade de cera na casca, como a região de cultivo, tipo de cana, tempo de colheita e, principalmente, o processo de remoção da casca. A cera obtida foi caracterizada quimicamente por análise de Ultravioleta Visível (UV-Visible) e Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Gasosa com Espectroscopia de Massas (GC-MS), o que pôde fazê-los concluir que a cera extraída diretamente da casca da cana-de-açúcar possui muitos compostos importantes para a sua possível aplicação em escala industrial.

A Índia é o segundo maior produtor de cana-de-açúcar no mundo, portanto é um país que também possui grande potencial como possível produtor de

cera da cana-de-açúcar. Sendo assim, estudos de extração de cera foram realizados com amostras de torta de filtro provenientes de fábricas de açúcar localizadas no distrito de Kolhapur, Maharashtra na Índia. BHOSALE et. al. (2012) utilizaram tortas vindas de quatro fábricas diferentes, realizando a extração utilizando Soxhlet por cerca de 4-6 h. Os solventes escolhidos para este experimento foram o tolueno e o benzeno. Dentre as diferentes tortas de filtro utilizadas, para o solvente tolueno o rendimento em cera bruta foi entre 5,40 ($\pm 0,05$) e 5,60 % ($\pm 0,04$), e para o benzeno, os rendimentos variaram entre 6,9 ($\pm 0,20$) e 7,3 % ($\pm 0,32$).

Como pôde ser visto nos estudos mostrados anteriormente, os solventes geralmente utilizados na extração de cera são hexano, clorofórmio, benzeno, éter de petróleo etc. Tendo em vista a toxicidade, preço e sustentabilidade dos solventes normalmente utilizados, surgem novas propostas para solventes, chamados de solventes verdes.

CHEMAT et al. (2012b) publicaram um artigo de revisão da bibliografia em que são listados os conceitos e princípios da “extração verde” aplicada a produtos naturais, ou seja, extração em que são utilizados solventes verdes. O conceito de química verde é definido por eles como o projeto, a invenção e a aplicação de produtos e processos químicos para diminuir ou eliminar o uso e geração de substâncias perigosas. Dentre os solventes verdes, os biosolventes são de grande importância quando se trata de substituir os solventes provenientes do petróleo. Esses biosolventes são de fontes renováveis e possuem alto poder de solvência, além de serem biodegradáveis e não-tóxicos. Porém, possuem certas limitações como: alto ponto de ebulição, alta viscosidade (em certos casos) e alto custo. Nesta categoria de solventes estão os terpenos como o limoneno, que é extraído de frutas cítricas e, principalmente, obtido como resíduo da indústria de suco de laranja e os pinenos (α e β -pinenos), extraídos de pinhos e que também são obtidos como subprodutos da indústria de celulose (TANZI et al., 2012).

Portanto, estes solventes terpênicos começaram, recentemente, a serem estudados como substituintes de diversos solventes oriundos do petróleo. Como tentativa para desenvolver aplicações para os solventes terpênicos na indústria, autores como MAMIDIPALLY e LIU (2004) e TANZI et al. (2012) apontaram o limoneno como tendo grande potencial para síntese e extração de compostos

naturais, sendo, assim, possível substituinte de químicos e solventes provenientes do petróleo.

MAMIDIPALLY e LIU (2004) fizeram uma primeira abordagem sobre a extração de lipídios utilizando o limoneno. Em seu trabalho foi utilizado o farelo de arroz como matéria-prima na extração de óleo. Foram obtidos excelentes resultados nessas extrações, sendo o rendimento para limoneno de 23,1 % contra 18,2 % do hexano no ponto ótimo. Na caracterização deste óleo, observou-se leve aumento (cerca de 0,5 %) no conteúdo de ácidos graxos livres na extração utilizando o limoneno quando comparada com o hexano, mostrando maior seletividade para estes compostos. Sendo assim, devido aos bons resultados, abriu-se caminhos para novos estudos utilizando o limoneno como alternativa ao hexano.

BERTOUCHE et al. (2013) usaram o α -pineno como solvente substituto aos solventes vindos do petróleo na extração dos óleos de amendoim, soja, girassol e oliva utilizando Soxhlet. A extração com esse solvente se mostrou mais segura tanto para o operador quanto para o ambiente devido à não toxicidade do mesmo e obteve rendimentos levemente maiores na extração de lipídios que o hexano. O rendimento de lipídios na extração com hexano dos óleo de amendoim, soja, girassol e oliva foram de $39,5 \pm 0,2$ %, $19,5 \pm 0,3$ %, $52,6 \pm 0,2$ % e $22,6 \pm 0,2$ %, respectivamente, enquanto os rendimentos para os mesmos óleos extraídos com α -pineno foram de $42,3 \pm 0,3$ %, $21,1 \pm 0,2$ %, $67,2 \pm 0,2$ % e $24,5 \pm 0,2$ %. Como pode-se observar os rendimentos obtidos com o α -pineno foram ligeiramente maiores que os do hexano, mostrando que este outro solvente terpênico também se mostrou uma boa alternativa ao hexano.

3.3.2. Solventes: hexano, limoneno e pineno

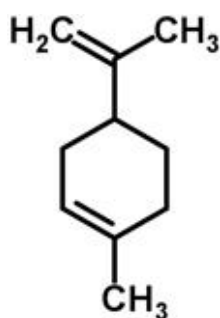
O hexano é o solvente mais aplicado na extração de produtos naturais, principalmente os óleos vegetais na indústria alimentícia. Sua aplicação possui muitas vantagens, como a sua alta capacidade de solubilizar os componentes dos óleos e também o seu baixo ponto de ebulição (aproximadamente 69 °C), que facilita a separação do soluto e a recuperação do solvente. Porém, o hexano é considerado um Composto Orgânico Volátil (VOC - *volatile organic compound*), poluidor do ar e

possível causador de problemas no sistema nervoso central quando a pessoa é exposta por longo período ou repetitivamente, além de ser obtido do petróleo, fonte fóssil e finita. Sendo assim, estas propriedades trazem inviabilidade à sua aplicação, já que pode afetar drasticamente o meio ambiente e os trabalhadores. Portanto, são necessários estudos de extrações com solventes alternativos ao hexano, que sejam, principalmente, não-tóxicos e obtidos de fontes renováveis, como os terpenos limoneno e pineno (CHEMAT et al., 2012a; MOITY et al, 2014; FISPQ hexano, 2017).

Limoneno é um biosolvente extraído de óleos essenciais de frutas cítricas, principalmente do óleo de laranja. Com uma produção de mais de 50 milhões de toneladas, a indústria de suco de laranja representa uma importante fonte de limoneno. Por causa do seu grande poder de solvência e baixa polaridade, este solvente é indicado para a extração de óleos e gorduras. (VIROT et al., 2008; CHEMAT et al., 2012b; CIRIMINNA et al., 2014).

Devido ao seu alto poder de solvência, o limoneno tem potencialidade para substituir solventes derivados de petróleo como diclorometano, tolueno e hexano para a extração de produtos naturais (MOYLER, 2002; CHEMAT et al., 2012b). Na Figura 2 observa-se a estrutura do limoneno.

Figura 2. Estrutura química do *d*-limoneno



O limoneno tem sido aplicado como inseticida, na área de cosméticos e também na indústria alimentícia. Ele é considerado como GRAS (geralmente reconhecido como seguro) pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos e seu interesse se dá pelas suas propriedades desengordurantes e de limpeza tanto doméstica quanto industrial, na aplicação como aromatizante e como

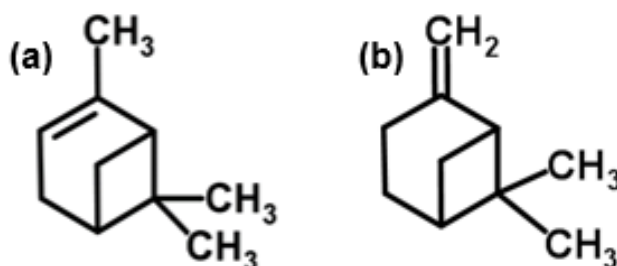
fragrância (TOPLISEK e GUSTAFSON, 1995; LIU e MAMIDIPALLY, 2005; AISSOU et al., 2016).

O pineno, também conhecido como turpentina e essência de terebentina, é um óleo obtido através da destilação da resina obtida principalmente de pinheiros, sendo, portanto, um solvente natural e renovável. Ele também pode ser obtido durante a polpação Kraft para produção de celulose e papel. Este solvente tem sido muito utilizado na produção de vernizes, para diminuir a viscosidade de tintas à base de óleo, como inseticida, como base para perfumes e na síntese da cânfora (CARMO, 1971; TANZI et al., 2012; BERTOUCHE et al., 2013).

Este solvente é constituído por uma mistura de terpenos e uma pequena quantidade de sesquiterpenos. Porém, conforme SOH e ECKELMAN (2016), na indústria o interesse está em relação aos compostos α -pineno e β -pineno. A porcentagem destes compostos presentes no óleo varia muito de acordo com o tipo de pinho utilizado, podendo apresentar diferentes porcentagens simplesmente baseado na região geográfica de extração da resina. Em temperatura e pressão ambiente, a sua densidade está entre 0,860 e 0,880 e é insolúvel em água e miscível em álcool absoluto e éter (CARMO, 1971; TANZI et al., 2012).

BERTOUCHE et al. (2013) utilizou α -pineno na extração de óleo de amendoim, soja, de girassol e de oliva, mostrando que o pineno pode atuar como um possível substituinte de solventes oriundos de petróleo. Até o momento não foram encontrados na literatura trabalhos que utilizassem, na extração de lipídios, a mistura do α -pineno e β -pineno como é apresentado na essência de terebentina, solvente utilizado neste trabalho, devido ao seu menor custo quando comparado às substâncias puras. Na Figura 3 observam-se as estruturas químicas dos dois compostos isômeros do pineno.

Figura 3. Estrutura química do (a) α -pineno e (b) β -pineno



Na Tabela 4, estão apresentadas as propriedades do limoneno e do α -pineno comparadas com as propriedades do hexano. Pode-se observar que propriedades como massa molar e ponto de ebulição são muito diferentes quando os terpenos são comparados ao hexano, porém, tais solventes se mostram bons quando avaliados do ponto de vista ambiental, pois apresentam baixo impacto, são renováveis e não tóxicos (CHEMAT et al., 2012a).

Tabela 4. Propriedades do hexano, do limoneno e do α -pineno

Propriedades	Hexano	<i>d</i> -Limoneno	α -Pineno
Fórmula molecular	C ₆ H ₁₄	C ₁₀ H ₁₆	C ₁₀ H ₁₆
Massa molar (g/mol)	86,18	136,23	136,23
Ponto de ebulição (°C)	68,7	175,5	155,0
Calor de vaporização (kJ/kg)	334	353	278
Densidade (g/mL)	0,6603	0,8411	0,8530
Tóxico	Sim	Não	Não
Impacto ambiental	Alto	Baixo	Baixo
Renovável	Não	Sim	Sim

Fonte: Adaptado de CHEMAT et al., 2012a; CHEMAT et al., 2012b; MAMIDIPALLY e LIU, 2004; LI e STEVES, 2016.

O poder de solvência de uma substância pode ser expresso em termos do valor Kauri-Butanol (KB). Este valor é uma medida internacional e padronizada do poder do solvente e é governado pela ASTM D1133. O resultado deste teste é um índice referido como valor KB. Quanto maior o valor KB, o solvente é mais agressivo ou ativo na habilidade de dissolver a goma Kauri. A Tabela 5 mostra os valores de KB para diversos solventes (DURKEE, 2014).

Tabela 5. Valores de KB para diversos solventes.

Solvente	KB
Hexano	26
Querosene	34
Limoneno	67
Pineno	61
Xileno	83
Tolueno	103
Tricloroetileno	130

Fonte: DURKEE, 2014.

Solventes como o hexano possuem baixos valores de KB enquanto solventes clorados como tricloroetileno e solventes naftênicos aromáticos (xileno e tolueno) possuem valores de centenas. O limoneno possui um KB de 67 enquanto o pineno possui KB de 61 (DURKEE, 2014).

Em termos dos parâmetros de solubilidade de Hansen, os parâmetros de alguns solventes são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros de Hansen para alguns solventes

Solvente	δ_d	δ_p	δ_h	δ_T
Hexano	15,2	0,8	2,0	15,4
Limoneno	16,7	2,2	4,9	17,5
α - Pineno	17,0	1,3	2,0	17,2
Tricloroetileno	18,0	3,1	5,3	19,0
Tolueno	18,0	1,4	2,0	18,2
Xileno	17,6	1,0	3,1	17,9

δ_d = força de dispersão; δ_p = forças polares; δ_h = forças de pontes de hidrogênio; δ_T = força intermolecular total.

Fonte: LI e STEVES., 2016.

Quanto mais próximos estiverem os parâmetros do soluto e do solvente, maior a solubilidade. Neste caso, os parâmetros de solubilidade de Hansen indicam que a força intermolecular total exercida por um solvente é composta por três componentes individuais, que diferem quanto ao mecanismo molecular de atração/repulsão. Estes componentes são forças polares (δ_p), de dispersão (δ_d) e pontes de hidrogênio (δ_h). Assim, é possível distinguir um solvente de outro quando eles exercem uma força intermolecular total (δ_T) similar, mas a contribuição de cada força é diferente. Dentre os solventes apresentados pode-se observar que o limoneno e o α -pineno apresentam as forças intermoleculares totais parecidas entre si e próximas do hexano (LI e STEVES, 2016).

Até o momento não foram encontrados na literatura estudos que utilizassem o limoneno ou o pineno como solventes extratores de ceras, apenas na extração de óleos. Portanto, dadas as características destes solventes, tais como: baixa polaridade, elevado KB e os parâmetros de Hansen serem parecidos com

outros solventes tradicionalmente utilizados no processo de extração da cera de cana-de-açúcar, há potencialidade destes solventes terpênicos serem adequados para substituí-los no processo de extração.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste item são apresentados os materiais e os métodos utilizados no desenvolvimento deste trabalho e que levaram a cumprir os objetivos propostos. Devido à necessidade de caracterização das matérias-primas realizou-se análise granulométrica, de umidade e de teor total de lipídios. Definiram-se, também, as condições a serem aplicadas no processo extrativo utilizando Soxhlet, bem como os métodos utilizados nas caracterizações químicas das ceras obtidas (FT-IR, índices de acidez e saponificação e cromatografia gasosa) e nas caracterizações térmicas (DSC e TGA).

4.1. MATERIAL

4.1.1. Matéria-prima

A casca de cana-de-açúcar foi gentilmente cedida pelo Sítio Santo Antonio, localizado na cidade de Rio Claro, São Paulo. A variedade da cana é a RB 96 6928, da safra 2015.

A torta do filtro rotativo foi gentilmente cedida pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol - CTBE/CNPEM, Campinas (Usina Costa Pinto, Piracicaba).

4.1.2. Solventes

O limoneno (safra 2017) foi gentilmente cedido pela indústria de suco de laranja Cutrale, localizada na cidade de Conchal - SP.

A terebentina P.A., adquirida da Dinâmica foi utilizada, como fonte de α -pineno e β -pineno.

O hexano P.A., adquirido da Anidrol, utilizado como solvente-padrão.

4.1.3. Reagentes e insumos de processo

Todos os reagentes químicos apresentam grau de pureza concordante com as especificações constantes nos métodos analíticos.

- (-) - α -pineno 98% utilizado como padrão cromatográfico - Sigma Aldrich
- (+) - β -pineno 99% utilizado com padrão cromatográfico - Sigma Aldrich
- (-)-*d*-limoneno 98% utilizado como padrão cromatográfico - Sigma Aldrich
- 1-Octacosanol utilizado como padrão cromatográfico – Sigma Aldrich
- Eicosanol utilizado como padrão cromatográfico – Sigma Aldrich
- Lesstanol 60 utilizado como padrão qualitativo de álcoois graxos (1,46 % de 1-tetracosanol; 12,20 % de 1-hexacosanol; 0,86 % de 1-heptacosanol; 59,00 % de 1-octacosanol; 1,84 % de 1-nonacosanol; 19,00 % de 1-triacontanol; 0,84 % de 1-dotriacontanol e 0,18 % de 1-tetratriacontanol) – cedido por Garuda International, Inc.
- Cera de carnaúba utilizada como cera-padrão - Multiceras
- Cera de candelila utilizada como cera-padrão - Multiceras
- Clorofórmio P.A. - Sinth
- Álcool metílico P.A. - Dinâmica
- Ácido clorídrico P.A. - Dinâmica
- Éter de petróleo P.A. - Dinâmica
- Tolueno P.A. - Dinâmica
- Hidróxido de sódio - Dinâmica
- Hidróxido de potássio - Dinâmica

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparação e caracterização das matérias-primas

As matérias-primas (torta de filtro e casca de cana-de-açúcar) cedidas ao trabalho foram lavadas antes de seu recebimento para a remoção máxima dos açúcares que compõem a cana. Portanto, por estarem com alto teor de umidade foram dispostas e secas a temperatura ambiente por aproximadamente 3 dias para diminuir sua umidade para menos de 10 %, tanto para facilitar o armazenamento,

evitando a proliferação de fungos, bactérias e insetos, como para que a matéria-prima ficasse dentro das especificações de caracterização e extração, pois a água é um composto polar e pode influenciar negativamente no processo extrativo devido à característica apolar dos compostos da cera (SLUITER et al., 2005).

Posteriormente, moeu-se a casca e a torta de cana-de-açúcar em moinho elétrico do tipo martelo (CV2 – TIGRE S.A.) com uma peneira de 2 mm de abertura, acoplado a um motor de indução de 3800 rpm, modelo CV5 da marca GENERAL ELETRIC para diminuição do tamanho das partículas, homogeneização e padronização das matérias-primas. Partículas muito grandes exercem má influência no processo de extração, pois diminuem a superfície de contato da matéria-prima com o solvente, dificultando a difusão do soluto. As matérias-primas foram caracterizadas em relação ao tamanho de partículas através de análise granulométrica, da umidade e do teor total de lipídios.

4.2.1.1. Análise granulométrica (classificação das partículas)

A classificação das partículas é uma etapa importante da caracterização das matérias-primas, pois o tamanho das mesmas influencia significativamente os valores de rendimento de cera obtidos pela extração (GUIZELINI et al., 2017). Portanto, as matérias-primas (casca e torta de filtro) foram avaliadas pela frequência (%) em que as partículas ocorrem nos seus diâmetros médios (d_m). Também foram avaliadas segundo a frequência acumulada, com o intuito de identificar o tamanho da partícula na qual 50 % do material possui diâmetro inferior a determinado valor (d_{50}).

A análise granulométrica foi realizada utilizando-se 6 peneiras da série Tyler da marca GRANUTEST, com diferença de diâmetro de abertura igual à razão $\frac{1}{2}$. Uma massa de 20 g foi selecionada e disposta na peneira de maior abertura, que se encontra acima das outras. As peneiras foram, então, submetidas à 20 minutos de agitação em um agitador eletrostático da marca PRODUTEST. As aberturas das peneiras utilizadas foram 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062 e 0,037 mm, que correspondem, respectivamente, aos Tylers 16, 32, 60, 115, 250 e 400.

4.2.1.2. Análise de umidade e teor total de lipídios das matérias-primas

As análises de umidade foram realizadas porque a umidade maior que 10% pode influenciar na extração tanto pela água ser um solvente lipofóbico, que pode influenciar na interação entre as moléculas de solvente e lipídios, quanto por ocupar espaço no cartucho, o que influencia na razão solvente-alimentação.

A análise de umidade foi realizada com o auxílio de uma balança de umidade, modelo MOC63u, da marca SHIMADZU, Brasil. Este equipamento se baseia no princípio da variação de massa, em que esta porcentagem é relativa ao teor de água contido no material que é evaporada mediante um programa de aquecimento. Para isso, foram utilizados cerca de 3 g de amostra e os ensaios foram realizados em triplicata. A balança foi programada para realizar uma rampa de aquecimento a uma taxa de $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, utilizando lâmpada de halogênio, até atingir $120\text{ }^{\circ}\text{C}$. O teor de umidade foi calculado automaticamente pela mesma quando a massa se tornou constante. O tempo de análise foi definido pela balança, sendo dependente da umidade da amostra.

Já a análise do teor total de lipídios foi realizada nas matérias-primas para a quantificação dos lipídios polares, apolares, extracelulares e intracelulares presentes na biomassa. Quantificando os lipídios presentes nas matérias-primas, pôde-se saber se as mesmas eram adequadas para extração de cera. Para serem adequadas, estes materiais deveriam possuir teor de lipídios entre 5 e 14 %, como descrito por PATURAU (1989). Além disso, o teor de lipídios totais pode ser utilizado no cálculo dos rendimentos de extração de cera bruta e cera purificada.

A determinação de lipídios totais foi realizada pelo método BLIGH e DYER (1959) modificado por RIOS et al. (2015), como descrito nos itens a seguir. Este método é dividido em quatro etapas: digestão ácida da biomassa, extração dos lipídios, evaporação do clorofórmio e pesagem dos lipídios.

4.2.1.2.1. Digestão ácida da biomassa

Pesou-se entre 300 e 500 mg de biomassa seca e triturada em um tubo de vidro com tampa utilizando balança analítica modelo ATX 224 da marca SHIMADZU e adicionou-se 5 mL de ácido clorídrico 2 M. A mistura foi homogeneizada por 2 minutos com o auxílio de agitador tipo vórtex marca FISATON,

modelo 772. Para digestão da parede celular, o tubo foi colocado em banho termostaticado, marca TECNAL, modelo TE-2005, a 80 °C por 1 h. Após o tempo decorrido, o tubo foi resfriado em água corrente até temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugado a 2000 rpm por 15 min em centrífuga, da marca KASVI, modelo K 14-4000. O líquido foi retirado usando uma seringa de vidro e agulha, e descartado em recipiente apropriado.

4.2.1.2.2. Extração dos lipídios

Adicionou-se ao tubo contendo a biomassa anteriormente digerida a mistura de 4 mL de metanol P.A., 2 mL de clorofórmio P.A. e 3,6 mL de água destilada, agitando-o por 5 minutos em vórtex. Posteriormente a suspensão foi transferida quantitativamente a um tubo plástico do tipo Falcon de 15 mL de capacidade. A mistura foi centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos. Retirou-se a fase inferior (clorofórmio + lipídios) utilizando seringa de vidro e agulha, transferindo-se esse primeiro extrato para uma placa de Petri de vidro.

Para garantir que a extração tivesse sido completa adicionou-se 4 mL de uma solução 10% v/v de metanol em clorofórmio ao resíduo contido no tubo Falcon (biomassa + metanol + água) e agitou-se no vórtex por 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos. Novamente o extrato (fase inferior) foi retirado e, então, acrescentado ao primeiro extrato. O metanol foi descartado em frasco adequado.

4.2.1.2.3. Evaporação do clorofórmio e pesagem dos lipídios

Evaporou-se o solvente da mistura clorofórmio/lipídios em capela com exaustão de ar até a obtenção de massa constante. A placa de Petri foi pesada para obtenção da massa dos lipídios e sua porcentagem calculada pela Equação 1.

$$\% \text{ lipídios} = \frac{\text{massa da placa com lipídio após secagem} - \text{massa da placa limpa e seca}}{\text{massa da amostra de biomassa}} \times 100 \quad (1)$$

4.2.2. Destilação da terebentina e caracterização dos solventes

Devido ao grande desvio padrão apresentado em ensaios preliminares utilizando a terebentina (pineno) e também devido aos valores de rendimento de

cera bruta fora do esperado, realizou-se a destilação da terebentina a fim de avaliar possível melhora na repetitividade dos experimentos devido à eliminação de impurezas no solvente. A destilação foi realizada sob vácuo em evaporador rotativo com banho à 90 °C.

Posteriormente, realizou-se a caracterização dos solventes para identificação da porcentagem de α -pineno, β -pineno e impurezas presentes na terebentina e identificação da composição do limoneno. As amostras diluídas em éter de petróleo (1 mg/mL) e foram analisadas por GC, utilizando-se um cromatógrafo a gás Agilent-6850, equipado com uma coluna de 50 % cianopropilfenil e 50 % dimetilpolisiloxano (BP-225 – SGE, com dimensões de 25 m x 320 μ m x 0,25 μ m), acoplada a detector de ionização de chamas. O injetor e o detector foram mantidos a 250 e 300 °C, respectivamente, e foram injetados 1 μ L de solvente por análise com razão de *Split* de 20:1. O forno da coluna iniciou a corrida à 40 °C, se mantendo nesta temperatura por 5 minutos. A primeira rampa de aquecimento se inicia a 40 °C e termina em 140 °C se mantendo nesta temperatura por 1 minuto à uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹. A segunda rampa de aquecimento acontece entre 140 e 220 °C, com taxa de aquecimento de 45 °C.min⁻¹, se mantendo nesta temperatura por 2 minutos, segundo BONON (2016). Foram injetados os padrões de limoneno, α e β -pinenos para identificação dos tempos de retenção destes compostos e para comparação com os compostos presentes nos solventes.

4.2.3. Desenvolvimento do método de extração e secagem das amostras

O Soxhlet foi o aparato escolhido para a realização das extrações por ser o equipamento padrão para extração de lipídios. Devido à necessidade de manter a repetitividade dos experimentos, foi selecionada apenas uma manta de aquecimento para a realização de todas as extrações, evitando, portanto, diferenças de potência entre as extrações.

Após a realização das extrações, os balões eram levados até o rotaevaporador para evaporação do solvente em excesso. Os solventes avaliados neste trabalho possuem ponto de ebulição entre 150 e 175 °C, que são

considerados altos. Por isso, para utilizar o banho de aquecimento do mesmo, que tem capacidade de até 90 °C, foi necessário utilizar uma bomba de vácuo de alta potência para que os solventes evaporassem nessa temperatura. Com a necessidade de vácuo dentro do equipamento, para controlar a taxa de evaporação do solvente e evitar o arraste da amostra através do mesmo foi instalada uma válvula na linha para controle da pressão no sistema e foram utilizados balões de 500 mL de capacidade em vez de balões de 250 mL, como inicialmente realizado.

Após a evaporação do solvente em excesso nas amostras, notou-se grande dificuldade em realizar a secagem do solvente, pois os solventes terpênicos não evaporavam em grande quantidade à temperatura ambiente. Para o hexano, as amostras foram secas em placas de Petri sob condições ambiente dentro da capela de exaustão de gases, porém para as amostras extraídas com os solventes terpênicos as placas foram dispostas em estufa de aquecimento. Foram então realizados testes de tempo de secagem.

4.2.3.1. Teste de tempo de secagem na estufa para os solventes terpênicos

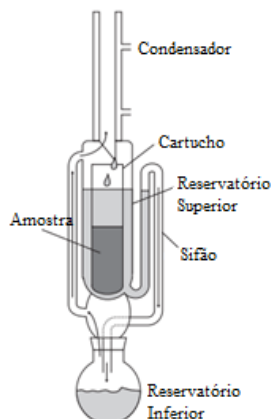
Para a secagem utilizou-se estufa da marca NOVA ÉTICA, modelo 402-3N à 90 °C. Para definição do tempo mínimo de secagem a ser utilizado para evaporação total do solvente, estudou-se o tempo de secagem das ceras da seguinte forma: uma amostra de cera foi extraída com limoneno no extrator Soxhlet durante 0,5 h, evaporou-se o solvente em excesso e então depositou-se a amostra em uma placa de Petri devidamente pesada e identificada. A placa foi levada à estufa e então sua massa foi medida durante certos intervalos de tempo, podendo-se, portanto, saber aproximadamente em quanto tempo de secagem a massa do extrato tornou-se constante. Este teste com o limoneno serviu, também, para a definição do tempo de secagem das extrações utilizando pineno, devido ao comportamento análogo mostrado pelos dois solventes.

4.2.4. Extração da cera bruta de cana-de-açúcar com hexano, limoneno e pineno

Foram realizadas extrações com os solventes pineno, limoneno e hexano em extrator do tipo Soxhlet com capacidade para 250 mL de solvente. Para cada

extração foram utilizados cerca de 10 g de matéria-prima (casca ou torta de filtro). A Figura 4 mostra, esquematicamente, um conjunto de extrator tipo Soxhlet.

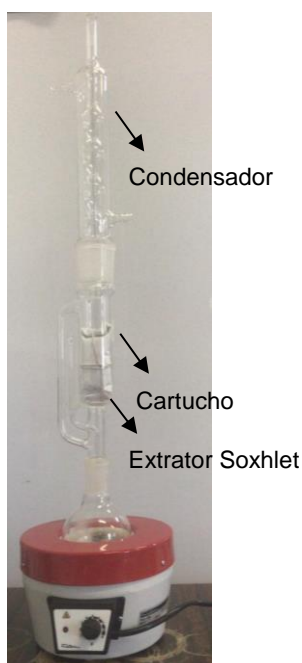
Figura 4. Esquema de um extrator Soxhlet.



Fonte: Adaptado de HARVEY, 1999.

Utilizando a balança analítica, modelo ATX 224, da marca SHIMADZU, foram pesados cerca de 10 g de matéria-prima dentro do cartucho feito com papel filtro qualitativo e barbante de algodão cru. Este cartucho foi disposto no interior do equipamento Soxhlet, na câmara de extração, como mostra a Figura 5. Após serem confeccionados os cartuchos foram armazenados em dessecador até que fossem utilizados para que houvesse o mínimo possível de alteração na umidade da matéria-prima.

Figura 5. Cartucho posicionado na câmara do extrator Soxhlet.



O cartucho que contém a biomassa foi então colocado no interior do aparelho Soxhlet e, em seguida, foram adicionados os 200 mL de solvente até que fosse todo sifonado para o balão. O aparelho foi encaixado no condensador e deu-se início à extração quando a manta de aquecimento (marca FISATON) foi ligada. Após o vapor gerado ter chegado à parte superior do equipamento e a primeira gota de solvente ter sido condensada, começou-se a contar o tempo de extração. Decorrido todo o tempo de extração, a manta foi desligada e o extrato foi para o rotaevaporador para evaporar o excesso de solvente. O balão foi encaixado no evaporador rotativo, da marca TECNAL, modelo TE-211. O banho foi deixado à 60 °C para as extrações com hexano e 90 °C para as extrações com pineno e limoneno, com rotação do balão de aproximadamente 60 rpm. Ligou-se então a bomba de vácuo da marca BUSCH, modelo RL 0006-A001-1001, para diminuir a pressão do sistema e, conseqüentemente, a temperatura de ebulição do solvente. O vácuo foi controlado para que não ocorresse arraste do extrato. Grande parte do solvente foi removida e o extrato restante foi transferido para uma placa de Petri seca e previamente pesada. Nas extrações realizadas com pineno e limoneno o extrato foi levado à estufa para ser seco a cerca de 90 °C por aproximadamente 15 h, como definido pelo teste de tempo de secagem na estufa (item 4.2.3.1.). Já as extrações realizadas utilizando o solvente hexano, devido ao seu baixo ponto de ebulição, foram secas em capela de exaustão de gases à temperatura ambiente até massa constante (aproximadamente 24 h). Os extratos foram pesados e posteriormente calculou-se o rendimento de cera bruta (R_{cb}) pela Equação 2. As extrações foram realizadas em triplicata e aplicou-se teste de Tukey utilizando o *software* Statistica 7.0 para constatar quais médias são estatisticamente diferentes a 95 % de confiança.

$$R_{cb}(\%) = \frac{\text{massa de cera bruta obtida}}{\text{massa de matéria-prima utilizada}} \times 100 \quad (2)$$

Os solventes foram recuperados para uso posterior em outros experimentos. Foi utilizado um banho termostatzado com circulação, modelo TE-2005, da marca TECNAL, para resfriamento dos condensadores dos conjuntos Soxhlet e também do evaporador rotativo.

4.2.5. Extração a frio e extração sem cartucho

Devido aos grandes rendimentos apresentados pelas extrações preliminares utilizando os terpenos foram realizados ensaios de extração a frio utilizando o limoneno como solvente, a fim de avaliar a influência da temperatura nos altos rendimentos dos processos extrativos. Estas extrações foram avaliadas, também, pela presença e ausência de luz no processo.

Utilizou-se cartucho contendo 10 g da casca da cana-de-açúcar e 200 mL de solvente, mesmas proporções do processo em extrator Soxhlet. O solvente foi adicionado à um béquer de 500 mL juntamente ao cartucho e vedado. Os ensaios sem a incidência de luz ocorreram em béqueres envoltos em papel alumínio. O processo extrativo ocorreu por 24 h em capela com exaustão de gases sob condições ambiente.

Após o tempo de extração o cartucho foi retirado do contato com o solvente e o procedimento de remoção dos solventes residual foi realizado conforme descrito no item 4.2.3.1. Também se calculou os rendimentos de cera bruta (R_{cb}) pela Equação 2.

Ainda a fim de ver a influência da temperatura no comportamento do solvente durante as extrações, realizou-se ensaios de 0,5 h em equipamento soxhlet utilizando o pineno como solvente, porém sem o cartucho que contém a matéria-prima. Após o ensaio, houve a evaporação do solvente em evaporador rotativo nas mesmas condições das extrações anteriores. Devido à inexistência de matéria-prima, não foi possível realizar cálculos de rendimento de cera bruta.

4.2.6. Purificação da cera de cana-de-açúcar

A cera bruta obtida foi purificada para a retirada de compostos não desejados, como açúcares e clorofila. Para isso a mesma foi homogeneizada com hexano a quente. A solução obtida foi resfriada à 10 °C em banho de gelo, mantida a esta temperatura durante 1 h e posteriormente centrifugada em equipamento de bancada, modelo K14-4000, da marca KASVI. O precipitado foi lavado com acetona a 10 °C e a fração de cera precipitada foi separada por filtração a vácuo com auxílio

de um Kitasato acoplado à bomba de vácuo, modelo TE-058, da marca TECNAL, e funil de Büchner. Foram utilizados papéis de filtro quantitativos com abertura de 8 µm próprios para partículas muito pequenas, faixa azul, filtração lenta. As amostras de cera purificada obtidas foram armazenadas em refrigerador da marca BRASTEMP até a realização das análises de caracterização. Com os resultados das purificações foi possível calcular os rendimentos de cera purificada e também os rendimentos relativos em função do teor total de lipídios presentes na amostra. As purificações foram realizadas em triplicata e aplicou-se teste de Tukey utilizando o *software* Statistica 7.0 para constatar quais médias são estatisticamente iguais a 95 % de confiança.

O rendimento de cera purificada (R_{cp}), em porcentagem, foi calculado conforme a Equação 3:

$$R_{cp} = \frac{(m_{cp} \times 100)}{m_{cb}} \quad (3)$$

Em que:

R_{cp} é o rendimento de cera purificada da extração (%).

m_{cp} é a massa de cera obtida após a purificação (g).

m_{cb} é a massa de cera bruta utilizada na purificação (g).

Com os valores de rendimento de cera purificada é possível calcular o rendimento relativo ao teor total de lipídios, segundo a Equação 4:

$$RR = \frac{TCP}{TTL} * 100 \quad (4)$$

Em que:

RR é o rendimento relativo ao teor total de lipídios (%).

TCP é a massa de cera purificada por massa de matéria-prima.

TTL é a massa total de lipídios por massa de matéria-prima.

4.2.7. Caracterização morfológica da matéria-prima antes e após a extração por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de MEV realizadas tiveram como objetivo a observação da casca *in natura* e após o processo de extração. Como a cera da cana-de-açúcar é epicuticular, ou seja, está depositada na camada mais exterior do colmo da planta, esta metodologia pode ser útil para a visualização de algum tipo de mudança na matéria-prima após as extrações (FERREIRA et al., 2005; QI et al., 2017). A morfologia das matérias-primas *in natura* e após as extrações foi analisada por um Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo Leo 440i, da marca LEO Electron Microscopy/Oxford (Cambridge, Inglaterra). Para o recobrimento das amostras utilizou-se um equipamento do tipo Sputter Coater POLARON, modelo SC7620 da marca VG Microtech (Uckfield, Inglaterra). As amostras foram fixadas em um porta-amostra específico do equipamento com auxílio de fita dupla face de carbono e realizou-se a metalização das mesmas conforme procedimento padrão (espessura aproximada de 92 Å) e posteriormente, a amostra foi levada para análise no MEV, em que foram capturadas imagens com 50, 1000, 2500 e 5000 vezes de aumento, como método adaptado de QI et al. (2017), que analisou somente aumentos de 1000 e 5000 vezes.

4.2.8. Caracterização química das ceras brutas e purificadas extraídas com hexano, limoneno e pineno

A caracterização química das ceras é uma parte muito importante do trabalho, pois com ela pode-se avaliar qualitativamente e quantitativamente os principais compostos das ceras. As caracterizações das ceras foram feitas por análise de infravermelho com transformada de Fourier para observação dos seus principais grupos funcionais, análise do índice de acidez e de saponificação que mostram o seu teor de ácidos graxos livres e esterificados e também por cromatografia gasosa a fim de identificar os principais compostos destas ceras e quantificar o octacosanol.

4.2.8.1. Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A técnica de FT-IR é constantemente utilizada na caracterização de ceras por mostrar os grupos funcionais das classes químicas presentes nas amostras, sendo que ceras vegetais geralmente apresentam hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos, álcoois e ésteres (COTTOM, 1994; INARKAR e LELE, 2012; QI et al., 2017). As análises foram realizadas de acordo com a metodologia descrita em ATHUKORALA et al. (2009), INARKAR e LELE (2012) e QI et al. (2017), utilizando um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), modelo NICOLET 6700, da marca THERMO SCIENTIFIC no modo atenuado (ATR) com acessório para FT-IR SMART OMNI SAMPLER. Foram utilizados comprimentos de onda na faixa de 4000 a 675 cm^{-1} , com 4 cm^{-1} de resolução e 128 *scans*.

4.2.8.2. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente com detector por ionização de chamas/espectrometria de massas (GCxGC-FID/MS)

Como essas ceras de cana-de-açúcar são biosintetizadas, suas composições podem variar de acordo com a região onde são produzidas, pelo tratamento recebido pela fonte e também pelo modo como são extraídas. As ceras de cana-de-açúcar, por serem provenientes de diferentes matérias-primas e também por estarem suscetíveis a diversos tipos de processamento prévio, podem apresentar composição de ácidos e álcoois distintas das apresentadas na literatura. A extração com solventes alternativos, como as realizadas neste trabalho, também podem influenciar na composição das ceras obtidas (PARISH e GRAINGER, 2017). Portanto, fez-se necessária a análise qualitativa da composição em ácidos e álcoois graxos e a quantificação do octacosanol nas ceras.

Os ensaios foram realizados em um cromatógrafo a gás TRACE 1300 acoplado a um espectrômetro de massa com analisador do tipo quadrupolo ISQ (Thermo Scientific). O sistema é equipado com um injetor por vaporização *split/splitless* (SSL) e um detector por ionização em chama (FID). A introdução das amostras foi feita com um amostrador automático TriPlus RSH para injeção de líquidos. A modulação de fluxo diferencial na configuração '*reverse fill/flush*' foi realizada usando a interface INSIGHTTM (SepSolve Analytical).

O injetor SSL e detector FID foram mantidos a 290 °C e 300 °C respectivamente. A linha de transferência e fonte de ionização foram operados a 300 °C e 200 °C. O forno cromatográfico foi programado de 170 °C até 340 °C a 3 °C.min⁻¹, o qual foi mantido em uma isoterma a 350 °C por 15 min.

Hélio foi utilizado como gás de arraste (1,0 mL.min⁻¹) e também como gás de modulação (12,6 mL.min⁻¹). O conjunto de colunas utilizado foi composto por uma coluna HP-5 MS de 30 m × 0,25 mm-id (df = 0,25 µm) e outra HP-50 MS de 5 m × 0,25 mm-id (df = 0,25 µm). Um capilar desativado de 5 m × 0,10 mm-id foi utilizado para balanceamento pneumático do sistema composto. O eluente da coluna secundária foi dividido entre o MS e FID na proporção de 1:5 utilizando capilares desativados de 5 m × 0,18 mm-id e 5 m × 0,32 mm-id, respectivamente. A taxa de aquisição do FID foi de 120 Hz. Um intervalo de varredura de 50 - 450 Th foi empregado para obtenção dos espectros de massa. O processamento dos cromatogramas foi feito usando o *software* ChromSpace (Markes International).

A identificação das substâncias foi realizada por comparação dos tempos de retenção de padrões (Lesstanol 60 e octacosanol) e espectrometria de massas para identificação dos ácidos octacosanoico e triacontanoico. A quantificação do octacosanol foi realizada por padronização interna, utilizando-se os padrões de eicosanol (padrão interno) e octacosanol.

Para que os ácidos graxos pudessem ser analisados por esta técnica, eles foram derivatizados e transformados em ésteres metílicos para diminuição dos pontos de ebulição e, conseqüentemente, dos tempos de retenção.

4.2.8.2.1. Derivatização dos ácidos graxos

A técnica de separação dos compostos das ceras com detecção por ionização de chama e espectrometria de massas é um dos métodos mais aplicados para análise de ceras. LOPES (2010) utilizou o método descrito por HARTMANN e LAGO (1973) com mudança de 5 para 20 minutos no tempo de saponificação, o qual foi aplicado para este trabalho.

O método consistiu na saponificação da amostra por 20 minutos em banho a 90 °C com reagente de saponificação constituído de hidróxido de potássio e

metanol. A amostra foi, então, resfriada com o auxílio de banho de gelo e foi adicionado o reagente de esterificação composto por cloreto de amônia, metanol e ácido sulfúrico. A esterificação foi realizada por 5 minutos em banho a 90 °C. A amostra foi resfriada novamente e então foram adicionadas a solução saturada de NaCl e a solução de eicosanol em éter de petróleo, solvente orgânico em que os ésteres metílicos e os álcoois graxos ficam retidos. O método completo está disponível no Anexo I.

4.2.8.2.2. Teor de octacosanol e composição em álcoois graxos

Para obtenção dos teores de octacosanol nas ceras, construiu-se de curva de calibração que relacionou as concentrações de eicosanol e octacosanol com as respectivas áreas dos picos. Para isto preparou-se uma solução de eicosanol em éter de petróleo na concentração de 0,5 mg/mL. Esta solução foi utilizada na última etapa do processo de derivatização da cera, sendo, portanto, a mistura éter/álcoois graxos/ácidos graxos analisados.

A partir dos cromatogramas, pôde-se construir o gráfico em que $y = \text{concentração octacosanol/concentração de eicosanol}$ e $x = \text{área de octacosanol/área de eicosanol}$. A seguir, foi realizada a regressão linear dos pontos que relacionam as áreas dos picos com as concentrações das amostras, dando origem a uma equação linear utilizada para o cálculo das concentrações de octacosanol.

A identificação dos principais álcoois graxos presentes nas ceras foi realizada comparando-se os tempos de retenção do padrão de álcoois graxos de C₂₄-C₃₀ (Lesstanol 60) com os tempos de retenção dos picos obtidos nas amostras de cera.

4.2.8.3. Índice de Acidez (IA)

O índice de acidez é o número de miligramas de hidróxido de potássio (KOH) utilizados para neutralizar um grama de cera e indica a quantidade de ácido graxo livre na amostra. Este é um método muito utilizado em ceras de insetos, vegetais e em ceras sintéticas que contém grupos de ácido carboxílico. Foi utilizado

o método AOCS Ca 5a-40, adaptado segundo LI e PARISH (1998), descrito por VIEIRA (2003). Colocou-se aproximadamente 1,0 g de cera em um erlenmeyer de 250 mL e dissolveu-se em 10 mL de toluol a quente até a fusão. Adicionou-se, então, 100 mL de etanol e 5 gotas de fenolftaleína. A titulação foi realizada com solução padronizada de hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 N. O índice de acidez é expresso em mg de KOH necessários para neutralizar 1 g de amostra e foi calculado pela Equação 5:

$$IA (mg KOH.g^{-1}) = \frac{V \times N \times 56,1}{m} \quad (5)$$

Em que:

V é o volume da solução de NaOH utilizado na titulação da amostra (mL).

N é a normalidade da solução de NaOH.

m é a massa da amostra (g).

4.2.8.4. Índice de Saponificação (IS)

O índice de saponificação é o número de miligramas de hidróxido de potássio que reage com um grama de cera sob temperaturas elevadas e indica a quantidade de ácidos carboxílicos livres e esterificados (HWANG et al., 2002). Foi utilizado o método AOCS Cd 3-25 adaptado segundo LI e PARISH (1998), descrito por VIEIRA (2003). Pesou-se cerca de 0,5 g de amostra que foi colocada em balão de 250 mL, adicionando-se 20 mL de toluol e de 10 mL de solução de KOH etanólica 0,5 M. A solução foi mantida sob refluxo por 4 h e, após o resfriamento, titulada com solução padronizada de ácido clorídrico (HCl) 0,5 N, utilizando a fenolftaleína como indicador. Foi preparado um branco, sem amostra. O índice de saponificação será calculado pela Equação 6:

$$IS (mg KOH.g^{-1}) = \frac{[(B-V) \times N \times 56,1]}{m} \quad (6)$$

Em que:

B é o volume da solução de HCl utilizado na titulação do branco (mL).

V é o volume da solução de HCl utilizado na titulação da amostra (mL).

N é a normalidade da solução de HCl.

m é a massa da amostra (g).

4.2.9. Caracterização térmica das amostras brutas e purificadas extraídas com hexano, limoneno e pineno

A caracterização térmica das ceras foi realizada em um calorímetro exploratório diferencial (*Differential Scanning Calorimeter* - DSC) e por termogravimetria (*Thermogravimetric Analysis* – TGA).

4.2.9.1. Análise por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de DSC é muito utilizada como método analítico de caracterizações térmicas como ponto de fusão, de cristalização e capacidade calorífica de óleos, gorduras e ceras. Ele disponibiliza informações únicas sobre o perfil energético dos compostos, tendo em vista que mede especialmente a temperatura e o fluxo de calor associados com as transições do material em função do tempo e aumento/diminuição da temperatura (ATHUKORALA et al., 2009). Foi utilizada uma balança microanalítica para pesagem prévia da amostra, modelo MX5, da marca METTLER TOLEDO, e um calorímetro diferencial exploratório, modelo DSC1, da marca METTLER TOLEDO, para identificação das curvas de fusão e cristalização. O equipamento utilizado é periodicamente checado e calibrado através da realização de uma corrida utilizando-se um cadinho com Índio metálico (p.e.=156,6 °C, $\Delta H = 28,71 \text{ J.g}^{-1}$) como amostra e um cadinho vazio como referência, e confrontando-se os valores de temperatura de fusão e entalpia medidos com a literatura correspondente.

Uma pequena porção de cada amostra (aproximadamente 10 µg) foi pesada em cadinhos de alumínio de 40 µL. Os cadinhos foram lacrados com tampas furadas e levados individualmente ao equipamento para análise. As análises foram realizadas de acordo com a metodologia de ATHUKORALA et al. (2009) e INARKAR e LELE (2012). A amostra foi aquecida de 25 °C a 105 °C a uma taxa de 10 °C.min⁻¹ para retirada de possíveis eventos térmicos. Foi mantida a 105 °C durante 1 min,

resfriada até $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $10\text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ e foi mantido a esta temperatura por 1 min. O segundo aquecimento foi de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os ensaios foram realizados em atmosfera inerte com fluxo de N_2 de 50 mL.min^{-1} . Então, as curvas de DSC do segundo ciclo de aquecimento foram utilizadas para determinar o intervalo de ponto de fusão e as curvas de resfriamento para o ponto de cristalização.

4.2.9.2. Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises de TGA são de grande importância para caracterização térmica das ceras para viabilizar a aplicação das mesmas na indústria, pois nesta análise é possível saber sob qual temperatura estes materiais começam a evaporar ou degradar (GUPTA et al., 2011). Foi utilizado um analisador termogravimétrico modelo TGA-50M da marca SHIMADZU. Para determinação da variação da massa das ceras com o aumento da temperatura, uma amostra de aproximadamente 5 mg foi pesada em um cadinho de porcelana e aquecida de 25 a $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de $10\text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$. Estes ensaios foram realizados com ar sintético a 50 mL.min^{-1} para reproduzir a composição do ar ambiente, que é naturalmente oxidativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Tendo como objetivo a avaliação de terpenos como solventes na extração da cera da cana-de-açúcar, após a caracterização das matérias-primas e dos solventes, realizou-se extrações preliminares utilizando limoneno, pineno e o solvente-padrão, o hexano. Devido às altas temperaturas de ebulição destes terpenos, foi necessário definir o tempo de secagem em estufa para garantir a retirada de todo solvente, pois o método comumente aplicado à solventes como o hexano, que envolve a secagem à temperatura ambiente, não se mostrou adequado. Definido o método de secagem, constatou-se que os rendimentos de cera bruta das extrações com os terpenos se mostraram muito acima do valor de lipídios totais, sugerindo a ocorrência de reações indesejadas durante o processo extrativo, provavelmente ocasionadas pela incidência de luz e pelas altas temperaturas às quais os solventes são submetidos. Após a purificação, porém, o produto destas reações indesejadas foi eliminado, dando origem à cera purificada. Sendo assim, calculou-se os rendimentos de cera purificada em relação ao teor total de lipídios. Após os processos de extração e purificação, as ceras brutas e purificadas foram submetidas às análises para caracterização química, como FT-IR e índices de acidez e saponificação, e também às análises para caracterização térmica como DSC e TGA. As ceras foram comparadas às ceras comerciais de carnaúba e candelila e apresentaram comportamentos dentro do esperado, pois possuem índices de acidez e saponificação similares, bem como pontos de fusão e outras propriedades, como entalpias de fusão. Ainda como caracterização química, também foram realizadas análises por cromatografia gasosa a fim de identificar os principais compostos das ceras e quantificar o octacosanol nos extratos obtidos. Sendo assim, estes resultados são apresentados e discutidos neste item da dissertação.

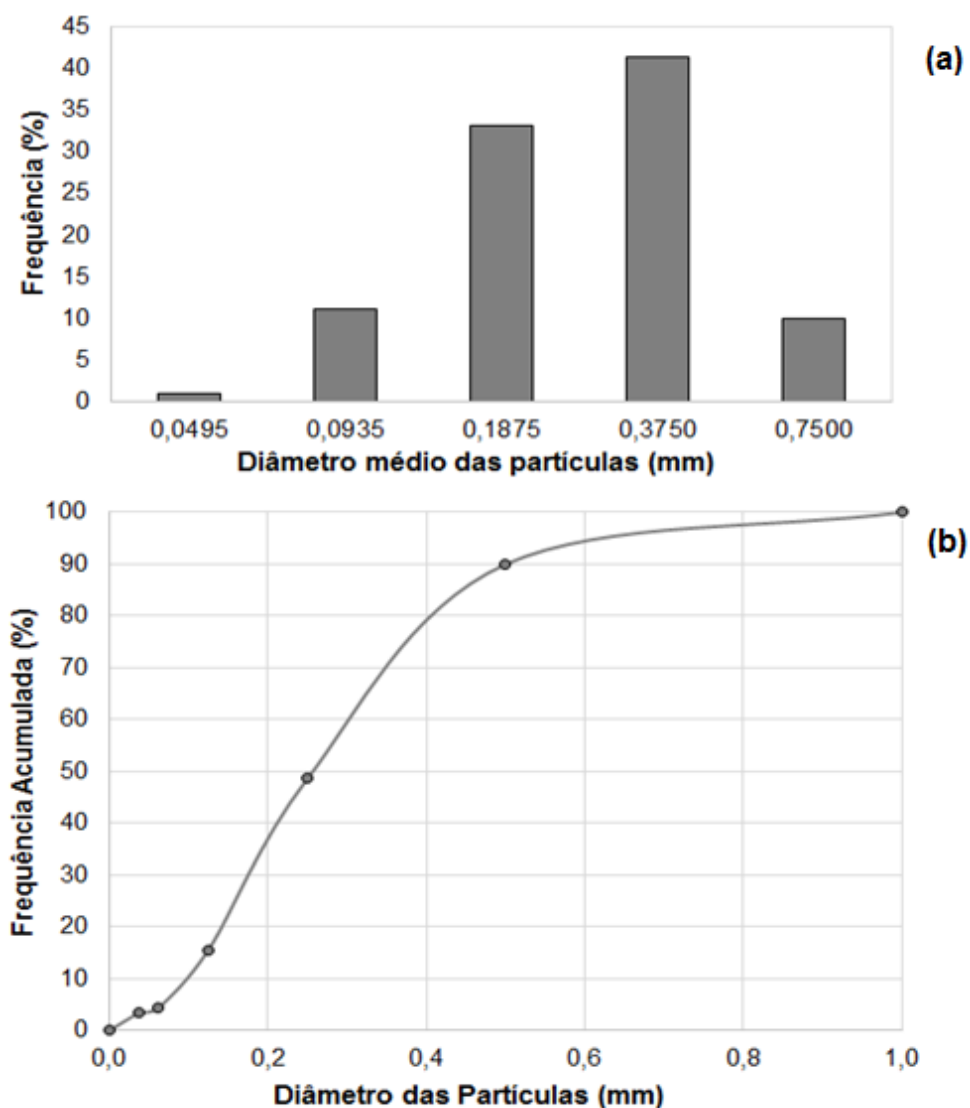
5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

A fim de caracterizar as matérias-primas (torta de filtro e casca da cana-de-açúcar) foram realizadas as análises de granulometria, de umidade e de teor de lipídios totais.

5.1.1. Análise granulométrica

A Figura 6(a) representa o histograma que mostra a frequência em que ocorre cada diâmetro médio (d_m) das partículas da casca de cana-de-açúcar. É possível observar que a maior parte das partículas da casca estão contidas entre os d_m de 0,1875 e 0,3750 mm. Na Figura 6(b) observa-se a frequência acumulada das partículas passantes. Constatou-se que diâmetro das partículas em que 50 % delas ficam retidas (d_{50}) foi de aproximadamente 0,2500 mm.

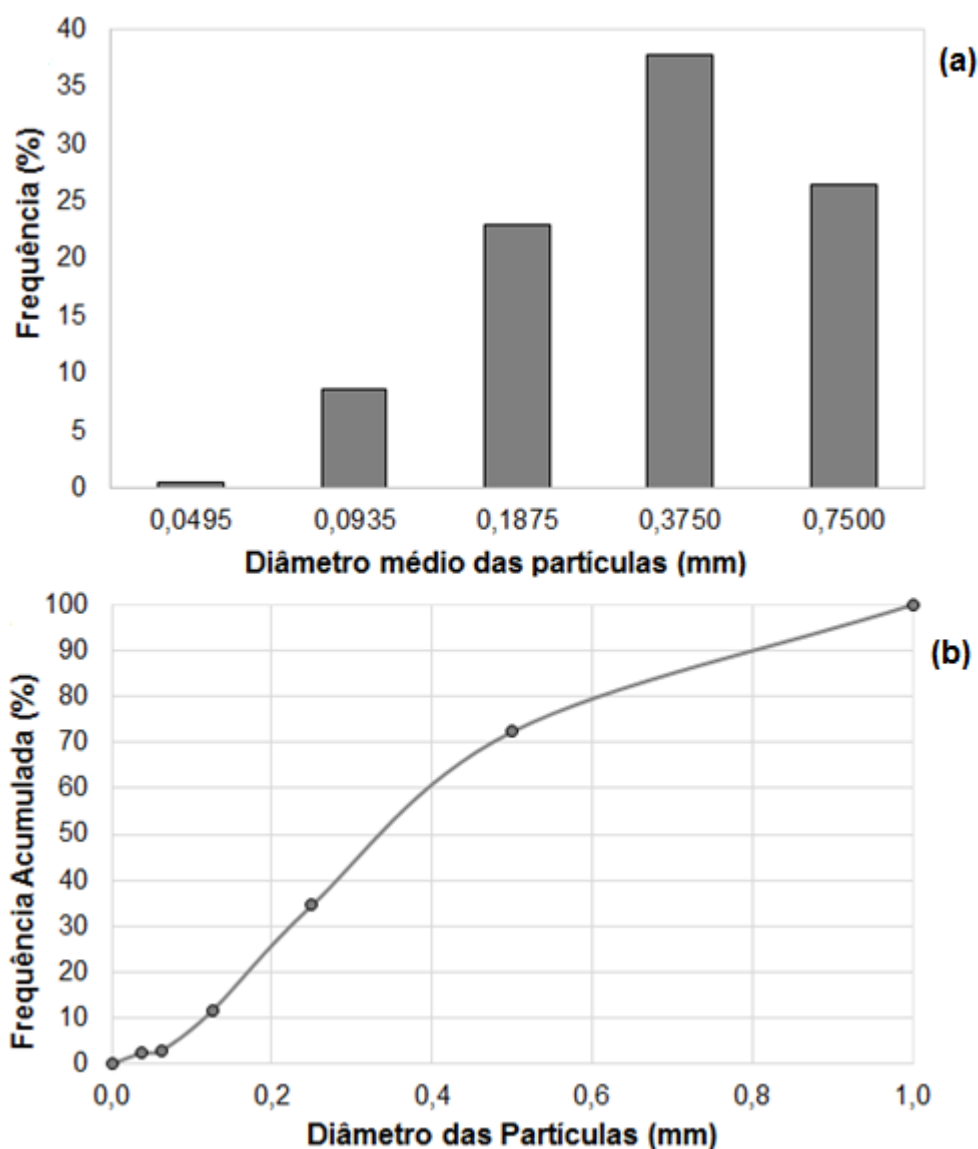
Figura 6. (a) Histograma da frequência (%) e diâmetro médio das partículas e (b) frequência acumulada das partículas passantes da casca de cana-de-açúcar



A Figura 7(a) representa o histograma que mostra a frequência em que ocorre cada diâmetro médio (d_m) das partículas da torta de filtro de cana-de-açúcar.

Observa-se que a maior parte das partículas estão contidas entre os d_m de 0,3750 e 0,7500 mm. Na Figura 7(b) observa-se a frequência acumulada das partículas passantes. Constatou-se que diâmetro das partículas em que 50 % delas ficam retidas (d_{50}) foi de aproximadamente 0,3400 mm.

Figura 7. (a) Histograma da frequência (%) e diâmetro médio das partículas e (b) frequência acumulada das partículas passantes da torta de fitro de cana-de-açúcar



Apesar de estudos como o de GUIZELINI et al. (2017), que mostrou a influência dos tamanhos de partícula no processo de extração da cera da casca de cana-de-açúcar, escolheu-se utilizá-la sem separação devido ao aumento considerável de tempo e energia necessários para estas separações.

5.1.2. Análise da umidade e teor total de lipídios

O teor de umidade e de lipídios totais para ambas as matérias-primas (casca da cana-de-açúcar e torta de filtro rotativo) são apresentados na Tabela 7. Os valores de umidade estão de acordo com o limite esperado, menores que 10% (SLUITER et al., 2005). Este valor é recomendado para extrações deste tipo, pois altos teores de umidade podem prejudicar o processo extrativo uma vez que a água é polar e, portanto, pode dificultar o contato entre o solvente e a cera, que são apolares.

Tabela 7. Resultados para ensaios de umidade e teor total de lipídios nas matérias-primas

Tipo de matéria-prima	Umidade \pm DP (%)*	Teor Total de Lipídios \pm DP (%)*
Casca da cana-de-açúcar	9,08 \pm 0,29	7,854 \pm 0,191
Torta de filtro da cana-de-açúcar	7,20 \pm 0,13	2,680 \pm 0,118

* Média de 3 replicatas; DP: Desvio Padrão

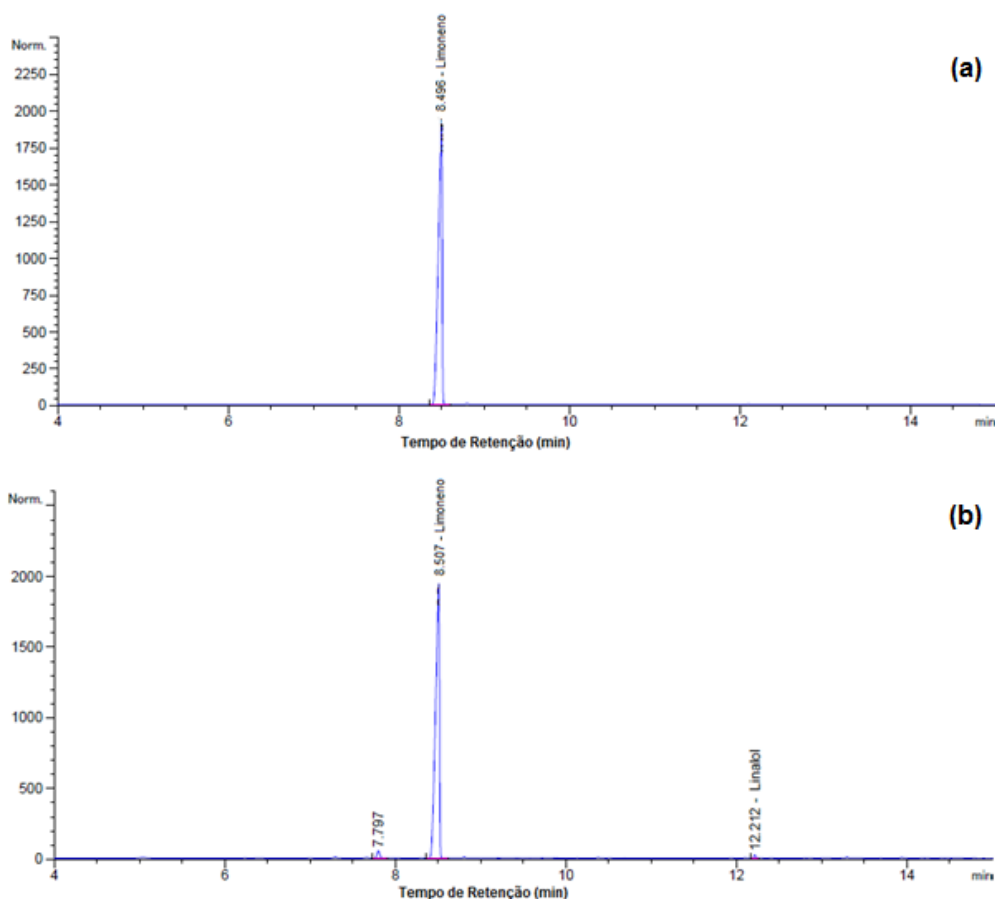
A torta de filtro apresentou resultados muito menores de teor total de lipídios que os apresentados na literatura, que são entre 5 e 14 % como dito por PATURAU (1989) e SOLOMON (2011). Isto ocorreu devido à grande suscetibilidade da matéria-prima de origem orgânica a possuir diferentes composições de acordo com a região onde foi cultivada, o tempo de colheita, tipo de tratamento e, principalmente, de que tipo de indústria ela é proveniente (RABELO et al., 2015). Com isso, tornou-se inviável a utilização desta torta de filtro no estudo da extração de ceras utilizando biosolventes, pois a pequena quantidade de cera obtida nas extrações traria dificuldades na boa execução dos experimentos, pois os desvios seriam da mesma ordem de grandeza que as medições realizadas, comprometendo a correta interpretação dos resultados. Foi escolhido, portanto, dar continuidade no trabalho apenas com a casca da cana-de-açúcar.

Contudo, vale ressaltar que tortas obtidas de outras procedências podem estar de acordo com os teores apresentados por PATURAU (1989) E SOLOMON (2011).

5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS SOLVENTES (LIMONENO E PINENO)

Realizou-se a análise composicional do limoneno e da terebentina, sendo a última a fonte de pineno utilizada neste trabalho. Essa análise foi necessária para avaliar a pureza dos solventes utilizados neste trabalho. Na Figura 8 são apresentados os cromatogramas obtidos para o padrão de limoneno (Figura 8a) utilizado na identificação do tempo de retenção deste composto e para o solvente limoneno utilizado nas extrações (Figura 8b). A integralização do cromatograma da Figura 8(b) por normalização de área revelou que aproximadamente 97,60 % do solvente é formado por limoneno, 1,83 % corresponde ao composto com tempo de retenção de 7,78 min, que não foi identificado, e 0,57 % é o composto com tempo de retenção 12,21 min, correspondente ao linalol. Os cromatogramas mostraram que a quantidade de impurezas presentes no solvente é muito pequena, não havendo a necessidade de qualquer processamento do mesmo antes da realização das extrações.

Figura 8. Cromatogramas do (a) padrão de limoneno e do (b) limoneno (solvente) utilizado nas extrações



Na Figura 9(a), em que se observa o cromatograma da amostra de terebentina comercial, foi possível identificar a presença de outros componentes além dos pinenos (identificados pela Figura 9d). Realizou-se, portanto, a destilação da terebentina comercial a fim de retirar ou minimizar a presença destes compostos indesejados no solvente a ser empregado nas extrações. Nas Figuras 9(b) e 9(c) são observados os cromatogramas da terebentina destilada e do resíduo da destilação, respectivamente. É possível concluir que a destilação foi eficaz na eliminação do composto com tempo de retenção em cerca de 13 min, não identificado.

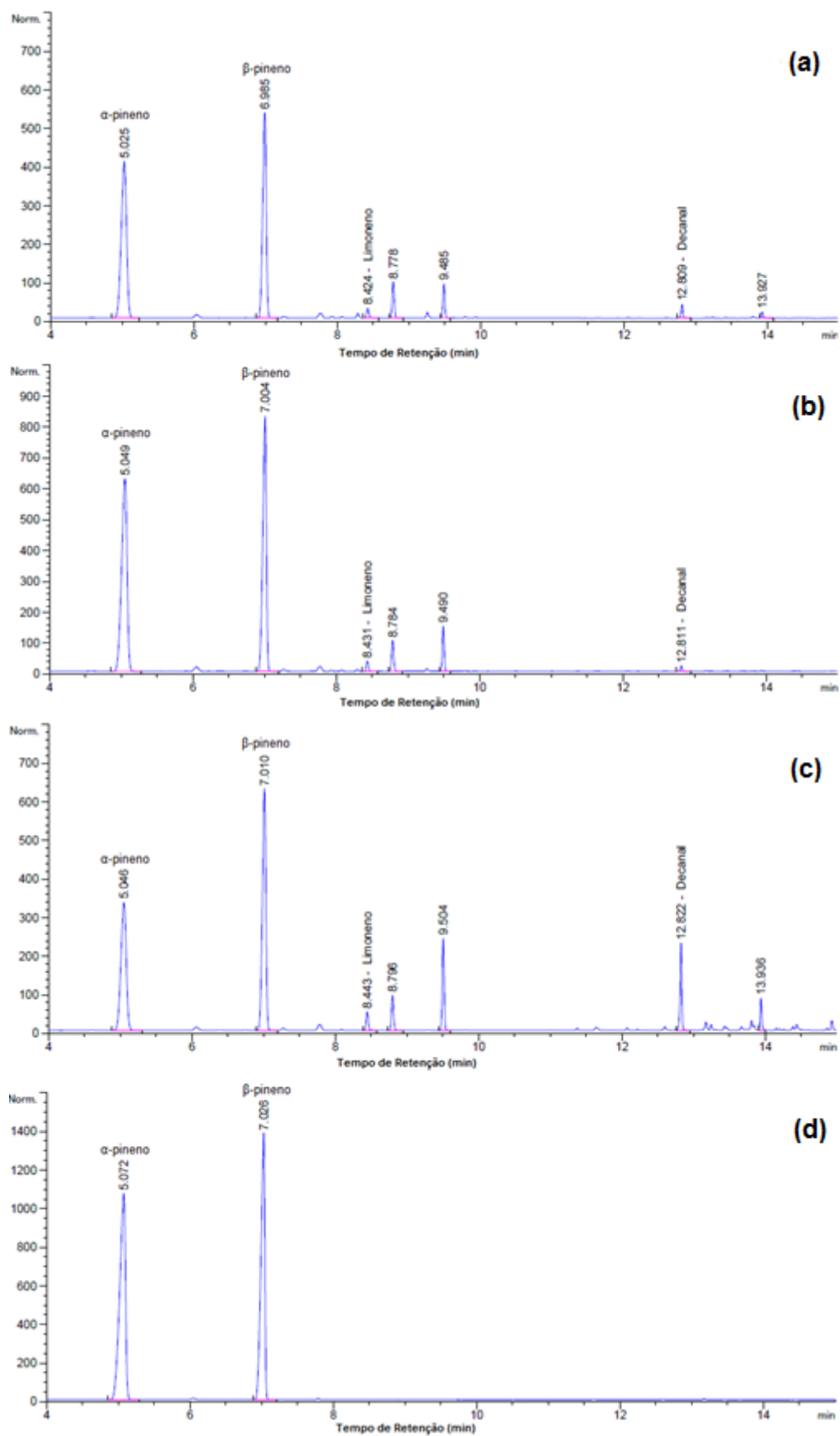
Observa-se, também no cromatograma do resíduo da destilação, o aumento considerável na intensidade dos picos que ocorrem em aproximadamente 9 e 12 min (decanal) quando comparados ao cromatograma do solvente comercial (Figura 9a).

Constatou-se, por normalização de área (Tabela 8), que a terebentina destilada é constituída por 47,43 % de α -pineno e 41,76 % de β -pineno encerrando 89,19 % de sua composição. Aproximadamente 1,27 % da amostra é composta por limoneno (8,4 min) e que 1,43 % é referente ao decanal (12,8 min). O restante da composição do solvente é de aproximadamente 4,41 % do composto retido em 8,7 min e 3,70 % do composto retido em 9,5 min, sendo ambos não identificados. A terebentina comercial possui maior quantidade dos compostos de maior ponto de ebulição e tempo de retenção, como 3,96 % do composto retido em 9,5 minutos, e 0,10 % do composto retido em 13,9 minutos.

Tabela 8. Análise composicional (%) da terebentina comercial, destilada e do resíduo da destilação

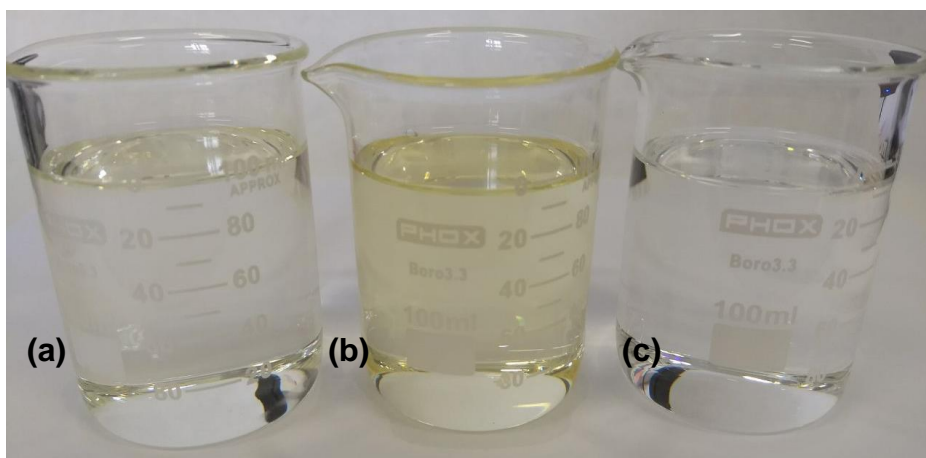
Amostras de terebentina	α -Pineno	β -Pineno	Limoneno	8,7 min	9,5 min	Decanal	13,9 min
Comercial	48,65	42,57	1,10	3,12	3,96	0,49	0,10
Destilada	47,43	41,76	1,27	4,41	3,70	1,43	-
Resíduo	33,58	41,88	2,07	3,72	8,60	7,48	2,67

Figura 9. Cromatogramas das amostras de (a) terebentina comercial, (b) destilada, (c) o resíduo da destilação e (d) padrões de α -pineno e β -pineno



Foi possível observar, também, diferença na coloração dos solventes, como se vê na Figura 10, em que: (a) corresponde à terebentina comercial, levemente amarelada, (b) é o resíduo da destilação, cor mais acentuada, e (c) corresponde a terebentina destilada. A cor límpida da terebentina destilada (Figura 10c) também corrobora a ideia de que o processo de destilação ajuda na eliminação de certas impurezas.

Figura 10. Amostras de (a) terebentina comercial, (b) resíduo da destilação e (c) terebentina destilada.



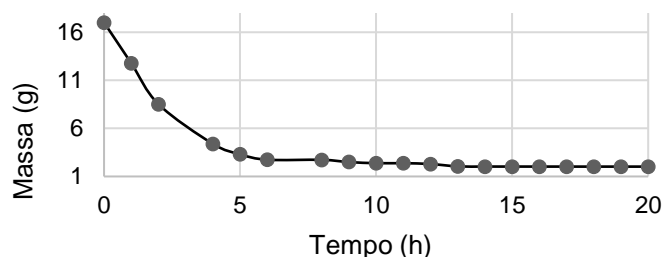
Sendo assim, após as análises composicionais e constatações visuais, notou-se que o processo de destilação foi eficaz e foi escolhida a terebentina destilada como solvente a ser empregado nas extrações. Refere-se a ela, portanto, como pineno.

5.3. TESTE PARA DEFINIÇÃO DO TEMPO DE SECAGEM PARA OS SOLVENTES TERPÊNICOS E PARA O HEXANO

Devido ao alto ponto de ebulição dos solventes terpênicos (entre 160 e 180 °C) foi necessário realizar testes preliminares para definição do método de secagem das ceras, pois o método aplicado ao hexano, que envolve secagem à temperatura ambiente, não se aplica a eles devido suas baixas taxas de evaporação nestas condições. Realizou-se uma extração por 0,5 h com o limoneno utilizando a casca da cana-de-açúcar, após a retirada do excesso de solvente no evaporador rotativo, o extrato foi colocado em uma placa de Petri e levado a estufa a 90 °C para

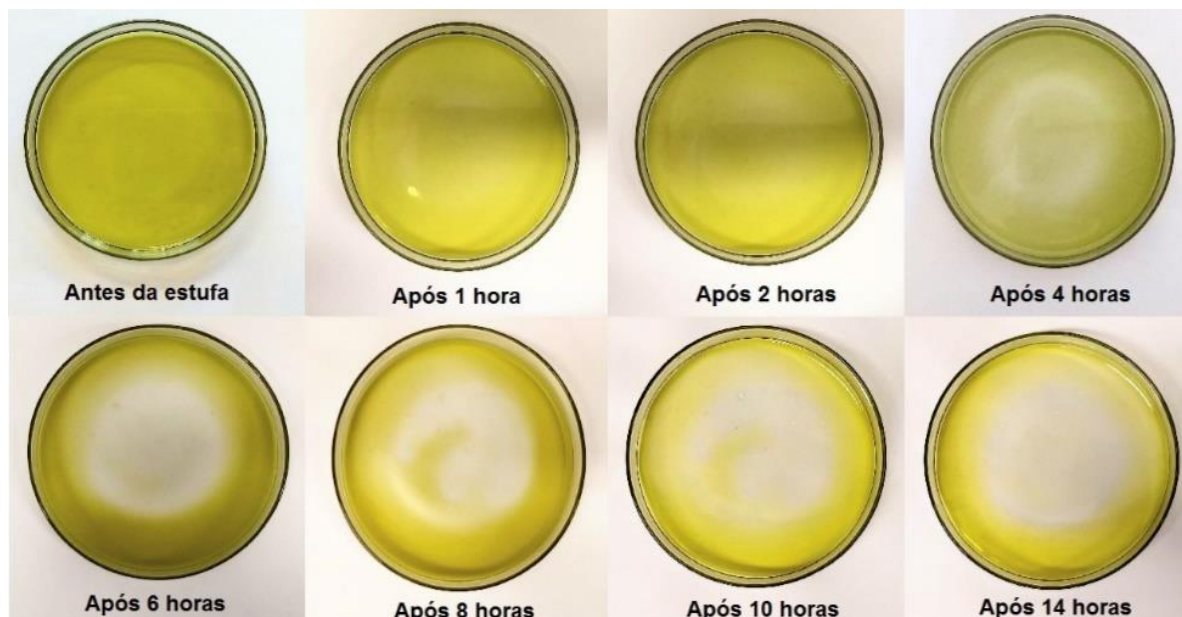
que a secagem do solvente residual fosse acompanhada. A amostra foi pesada em balança analítica ao longo do tempo e o gráfico da Figura 11 mostra o comportamento da massa do extrato em função do tempo. Pôde-se observar que a partir de 14 h de estufa a massa do extrato é praticamente constante com o passar do tempo, o que indica que praticamente todo o solvente foi eliminado.

Figura 11. Teste de tempo de secagem para extração realizada com limoneno.



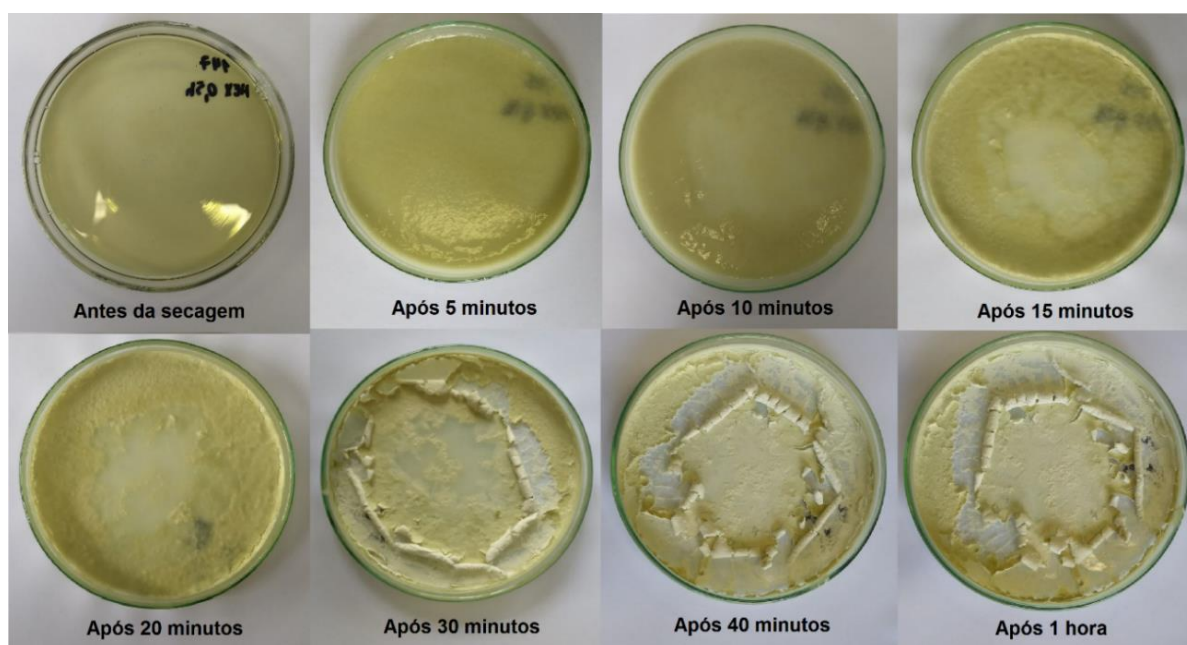
Na Figura 12 observa-se a aparência do extrato obtido com limoneno ao longo do tempo que permaneceu em estufa. Pôde-se observar que a amostra não apresenta alteração visível de cor ou textura apesar da diminuição de seu volume devido à evaporação do solvente, o que indica não ocorrer nenhum tipo de reação na amostra que esteja relacionada ao tempo de permanência na estufa à 90 °C. Sendo assim, para a secagem de todas as extrações posteriores realizadas com limoneno e com o pineno, foi definido 15 h como tempo para realização da secagem para garantir evaporação total do solvente contido na amostra.

Figura 12. Acompanhamento da secagem do extrato obtido com limoneno em função do tempo.



No caso da utilização de hexano como solvente extrator, devido à sua alta taxa de evaporação à temperatura ambiente, tornou-se inviável acompanhar a variação da massa com o tempo utilizando a balança, pois não era possível para a mesma atingir a estabilidade. Foi realizado, portanto, o teste visual de secagem, como mostrado na Figura 13. Constatou-se que, visualmente, após 40 minutos de secagem a amostra já não se modificava, porém, a amostra foi seca por 24 h em temperatura ambiente para garantir secagem total e a remoção de qualquer solvente residual, como reportado por ATTARD et al. (2015a).

Figura 13. Acompanhamento da secagem do extrato obtido com hexano em função do tempo.



Assim, para as extrações com hexano, definiu-se que a secagem seria realizada por 24 h à temperatura ambiente em capela de exaustão de gases, sem a necessidade da estufa. O extrato obtido com o hexano possui características visuais que diferem do extrato obtido com o limoneno, como a cor, a textura mais heterogênea e também a aparência mais quebradiça.

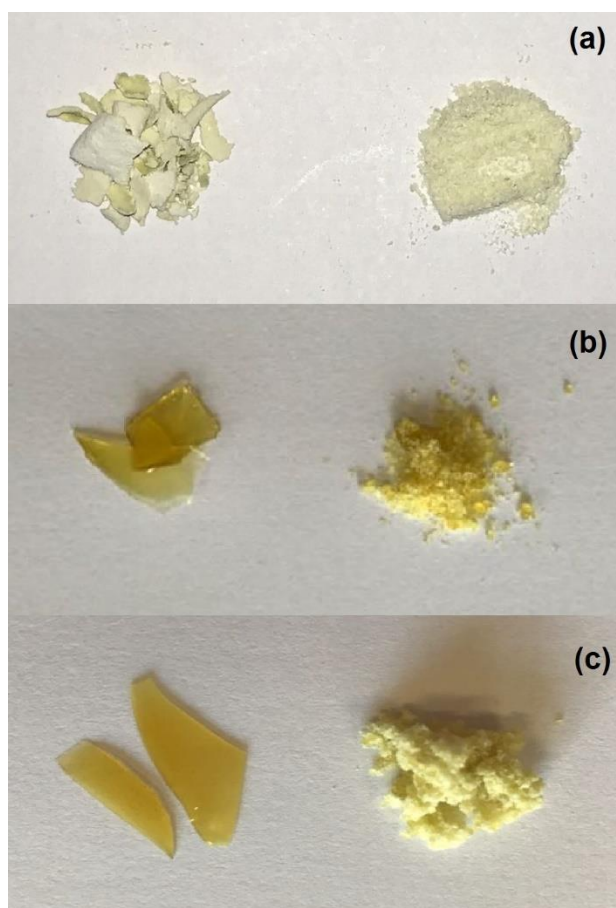
5.4. EXTRAÇÃO DA CERA BRUTA COM HEXANO, LIMONENO E PINENO

Após a caracterização dos solventes terpênicos a serem utilizados (limoneno e pineno), deu-se início ao processo extrativo. Foram realizadas as

extrações com os solventes hexano, limoneno e pineno por 0,5; 1; 2 e 4 h para obtenção da cera bruta de cana-de-açúcar.

Os rendimentos de cera bruta e os desvios padrão obtidos nas extrações com todos os solventes estão dispostos na Tabela 9, enquanto as imagens das ceras brutas estão dispostas na Figura 14. As extrações foram realizadas primeiramente com o hexano, pois ele é o solvente-padrão utilizado na extração de lipídios, e o extrato obtido apresentou característica quebradiça e de pó, com cor branco-esverdeada, como mostrado na Figura 14(a).

Figura 14. Cera bruta da cana-de-açúcar extraída com (a) hexano, (b) limoneno e (c) pineno antes e após moagem



De acordo com a Tabela 9, para o hexano, as porcentagens de cera bruta obtidas variaram de 7,255 a 8,341 %, sendo que só apresentaram diferença significativa entre si os rendimentos de cera bruta obtidos nos tempos de 0,5 e 4 horas, como mostrou o teste de Tukey realizado com 95% de confiança. Os

resultados se mostram próximos do teor de lipídios totais (7,854 %) obtido para a casca. Portanto, em termos de cera bruta, pode-se concluir que o aumento de rendimento causado pelo aumento do tempo de extração, cerca de 1 %, não justifica o emprego de tempos maiores quando utiliza-se hexano como solvente e, conseqüentemente, o gasto energético necessário para manter as extrações funcionando.

Tabela 9. Rendimentos de cera bruta (R_{cb}) por tempo de extração com hexano, limoneno e pineno

Tempo de extração (h)	R_{cb} (hexano) \pm DP (%) [*]	R_{cb} (limoneno) \pm DP (%) [*]	R_{cb} (pineno) \pm DP (%) [*]
0,5	7,225 \pm 0,393 ^a	29,867 \pm 0,192	18,031 \pm 0,691
1,0	7,399 \pm 0,299 ^{a,b}	37,825 \pm 0,575	26,105 \pm 1,335 ^d
2,0	7,780 \pm 0,686 ^{a,b}	62,166 \pm 0,726 ^c	29,137 \pm 1,615 ^d
4,0	8,341 \pm 0,364 ^b	64,454 \pm 0,692 ^c	39,112 \pm 1,132

* Média de 3 replicatas; DP: Desvio Padrão; Médias com a mesma letra são estatisticamente iguais a 95% de confiança.

Diferentemente da cera bruta extraída com hexano, as ceras obtidas com limoneno e pineno apresentam característica pegajosa quando manuseadas à temperatura ambiente, mas se tornam quebradiças quando resfriadas. A cor da cera, após secagem, é amarela e com aparência opaca, como se pode observar nas Figuras 14(b) e 14(c), cujas imagens foram adquiridas com as amostras ainda resfriadas. A cera obtida com o pineno, porém, adquire cor esbranquiçada após a moagem com gral e pistilo.

As extrações realizadas com o limoneno apresentaram rendimentos de cera bruta entre 29 e 65 % mostrando-se dependente do tempo de extração. Quanto maior o tempo, maior o rendimento. Este comportamento também foi observado nas extrações utilizando pineno, porém variando entre 18 e 40 % (Tabela 9). Sabendo-se que a casca encerra apenas cerca de 7,8 % de lipídios totais, os valores de rendimentos de cera bruta obtidos pela extração com os terpenos estão muito acima do esperado, evidenciando que outros processos podem estar acontecendo além do fenômeno da extração. Para entender se a temperatura utilizada na extração estaria afetando os valores de rendimento, foram realizados ensaios de extração a frio com o solvente limoneno. Como resultado, verificou-se que rendimentos maiores que o

esperado também foram encontrados na extração a frio (Tabela 10), evidenciando que os altos rendimentos não são ocasionados, necessariamente, pelo emprego de temperatura na extração.

A fim de verificar se a incidência de luz estaria afetando os valores de rendimento, realizou-se a extração a frio agora na ausência de luminosidade. Altos valores de rendimento foram obtidos também na ausência de luz, entretanto verificou-se valores menores, em cerca de 15 %, comparado ao ensaio na presença de luz (Tabela 10).

Isto levou à conclusão de que o solvente é suscetível à influência da luz e que, provavelmente, também ocorrem reações indesejadas paralelas ao processo de extração, não estando estas, necessariamente, ligadas somente às elevadas temperaturas utilizadas nas extrações com os solventes terpênicos.

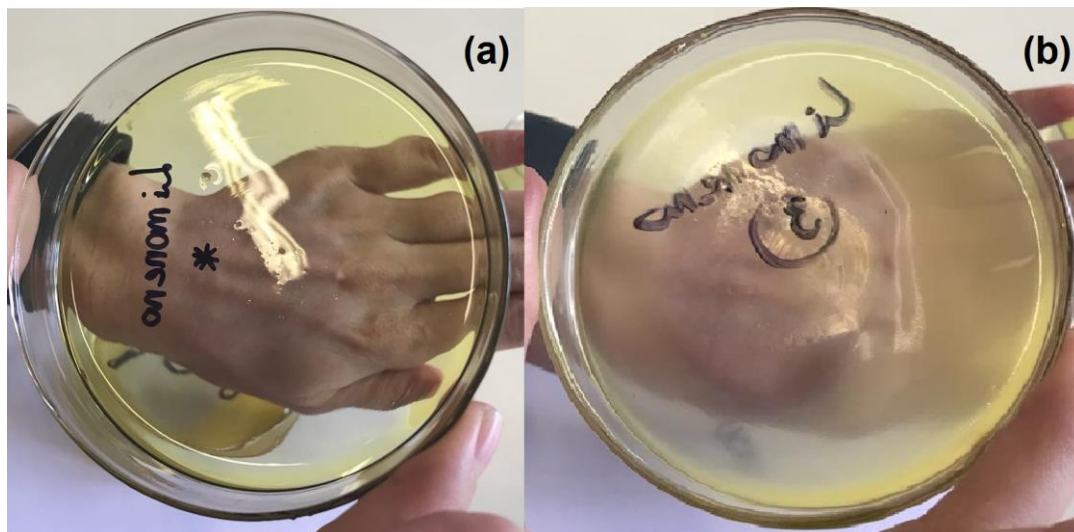
Tabela 10. Rendimentos de cera bruta (R_{cb}) obtidos nas extrações a frio com limoneno por 24 h

Tipo de extração	$R_{cb} \pm DP$ (%)[*]
Com luz	45,22 \pm 3,97
Sem luz	30,48 \pm 1,43

^{*} Média de 3 replicatas; DP: Desvio padrão

O extrato das extrações a frio obtido após evaporação do solvente e secagem em estufa (mesmo método aplicado às extrações Soxhlet) possui cor amarelada muito próxima à obtida na extração realizada com temperatura, porém ele é de aparência transparente (Figura 15a), enquanto o extrato obtido pela extração no Soxhlet é opaco (Figura 15b). Realizou-se, portanto, a purificação do material da extração a frio, porém o processo não resultou em nenhum material, o que confirma que o processo de extração a frio não foi efetivo na extração de cera. Desta forma, os valores de rendimentos obtidos, provavelmente, se devem à possíveis oligomerizações dos terpenos durante o processo de extração, que em presença de luz e temperatura podem ter suas duplas ligações quebradas, favorecendo a formação de dímeros, trímeros e tetrâmeros.

Figura 15. Extrato de limoneno obtido (a) após extração realizada a frio e (b) após extração em Soxhlet.



Realizou-se, também, testes com o pineno a fim de verificar a influência da temperatura no processo de extração via soxhlet. Para isso, realizou-se ensaios por 0,5 h na ausência matéria-prima e, posteriormente, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo nas mesmas condições das extrações comuns e o extrato seco em estufa à 90 °C.

Realizou-se os ensaios em triplicata com 200 mL de solvente e foram obtidos $2,63 \pm 0,16$ g de extrato após a secagem. Conclui-se, então, que o solvente influencia grandemente nos altos valores de rendimento de cera bruta, pois as possíveis oligomerizações ocorrem mesmo na ausência de matéria-prima, indicando serem inerentes aos solventes terpênicos.

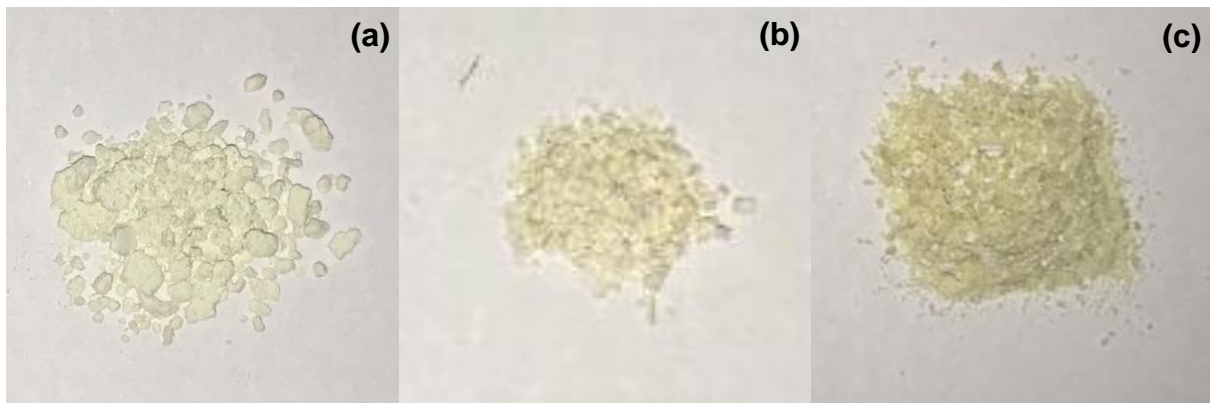
5.4.1. Purificação da cera bruta

A purificação dos extratos obtidos foi realizada para eliminação das impurezas como clorofila, açúcares e resíduos da extração

Na Figura 16, são observadas as ceras purificadas de cana-de-açúcar extraídas com (a) hexano, (b) limoneno e (c) pineno. Após a purificação as ceras obtidas a partir de solventes terpênicos adquiriram tonalidade e textura muito

próximas à cera extraída com hexano, indicando que o processo de purificação foi eficaz.

Figura 16. Ceras purificadas de (a) hexano, (b) limoneno e (c) pineno



Na Tabela 11 observam-se os valores médios de rendimento de cera purificada (R_{cp}) para os solventes utilizados neste trabalho.

Tabela 11. Rendimentos das ceras de cana-de-açúcar purificadas (R_{cp})

Tempo de extração (h)	R_{cp} (hexano) \pm DP (%)[*]	R_{cp} (limoneno) \pm DP (%)[*]	R_{cp} (pineno) \pm DP (%)[*]
0,5	69,712 \pm 0,302 ^a	10,648 \pm 0,193 ^c	13,597 \pm 0,277 ^e
1,0	71,990 \pm 0,218 ^a	12,889 \pm 0,531 ^c	16,239 \pm 0,298 ^f
2,0	78,328 \pm 0,259 ^b	8,596 \pm 0,462 ^d	15,829 \pm 0,228 ^f
4,0	78,477 \pm 0,279 ^b	8,833 \pm 0,382 ^d	14,940 \pm 0,206 ^{e,f}

* Média de 3 replicatas; DP: Desvio Padrão; Médias com a mesma letra são estatisticamente iguais a 95% de confiança.

Pôde-se observar que os rendimentos de cera purificada (R_{cp}) para as extrações com o hexano se mostraram muito maiores que as extrações com os solventes terpênicos. Isto acontece pois, durante o processo de extração com os solventes terpênicos, ocorrem reações indesejadas que produzem novos compostos que são retirados durante o processo de purificação.

Portanto, para padronizar os resultados de extração, calculou-se os rendimentos relativos (RR) ao teor de lipídios totais da casca da cana-de-açúcar, representados na Tabela 12.

Avaliando os rendimentos relativos ao teor total de lipídios, verifica-se que para todos os solventes estudados, os valores de RR aumentam com o tempo. Isto demonstra que maiores tempos de extração proporcionam maior obtenção de cera. Na Tabela 12, verifica-se também que para todos os tempos avaliados, os valores de rendimento obtidos com hexano sempre superam os obtidos com solventes terpênicos. Entretanto, com a utilização de tempos maiores durante o processo extrativo, os solventes terpênicos podem alcançar os mesmos rendimentos obtidos com hexano. Apesar da utilização de tempos maiores, ressaltam-se os benefícios da utilização de solventes não tóxicos e renováveis tanto na operação, oferecendo maior segurança aos trabalhadores, quanto na aplicabilidade do produto obtido, como é o caso da aplicação do Policosanol como fármaco. Portanto, é possível perceber que os terpenos pineno e limoneno são solventes com potencial aplicação industrial para a cera da cana-de-açúcar.

Tabela 12. Rendimentos relativos ao teor de lipídios totais (RR) das ceras de cana-de-açúcar extraídas com hexano, limoneno e pineno

Tempo de extração (h)	RR hexano (%)	RR limoneno (%)	RR pineno (%)
0,5	64,129	40,492	31,216
1,0	67,819	62,074	53,975
2,0	77,590	67,825	60,087
4,0	83,343	72,488	74,628

5.5. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA MATÉRIA-PRIMA ANTES E APÓS AS EXTRAÇÕES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A casca de cana-de-açúcar utilizada como matéria-prima na extração da cera passou não só por mudanças de composição, mas também por mudanças morfológicas ao longo do processo de extração, devido à retirada da cera de sua superfície, conforme QI et al. (2017). Portanto, para possível visualização destas mudanças na casca, foram realizadas as análises de MEV na matéria-prima após as extrações durante 0,5 h com (a) hexano, (b) limoneno e (c) pineno e antes da extração (d) *in natura* com aumento de 50, 1000, 2500 e 5000 vezes.

Na Figura 17 estão as imagens capturadas com aumento de 50 vezes, para observação panorâmica da casca. Pode-se observar grande diferença na morfologia das partículas, apesar de terem sido previamente moídas. A diferença na imagem da casca *in natura* se dá unicamente pela menor quantidade de matéria-prima aderida à fita de carbono.

Nas Figuras 18, 19 e 20 estão as imagens capturadas de um mesmo segmento de biomassa, porém com diferentes aproximações. Pode-se observar a aparência rugosa e filetada que a casca apresenta, sendo possível perceber que a casca *in natura* (d) parece estar com suas “canaletas” mais preenchidas por certo composto, enquanto as biomassas que já passaram pelo processo extrativo de 0,5 h apresentam a superfície mais lisa (a, b, e c). Observa-se também que a superfície da biomassa que foi extraída com hexano aparenta estar mais limpa, o que pode estar relacionado aos maiores rendimentos relativos de extração quando comparado aos terpenos.

Figura 17. Captura panorâmica (aumento 50x) da casca após 0,5 h de extração com (a) hexano, (b) limoneno, (c) pineno e (d) *in natura*.

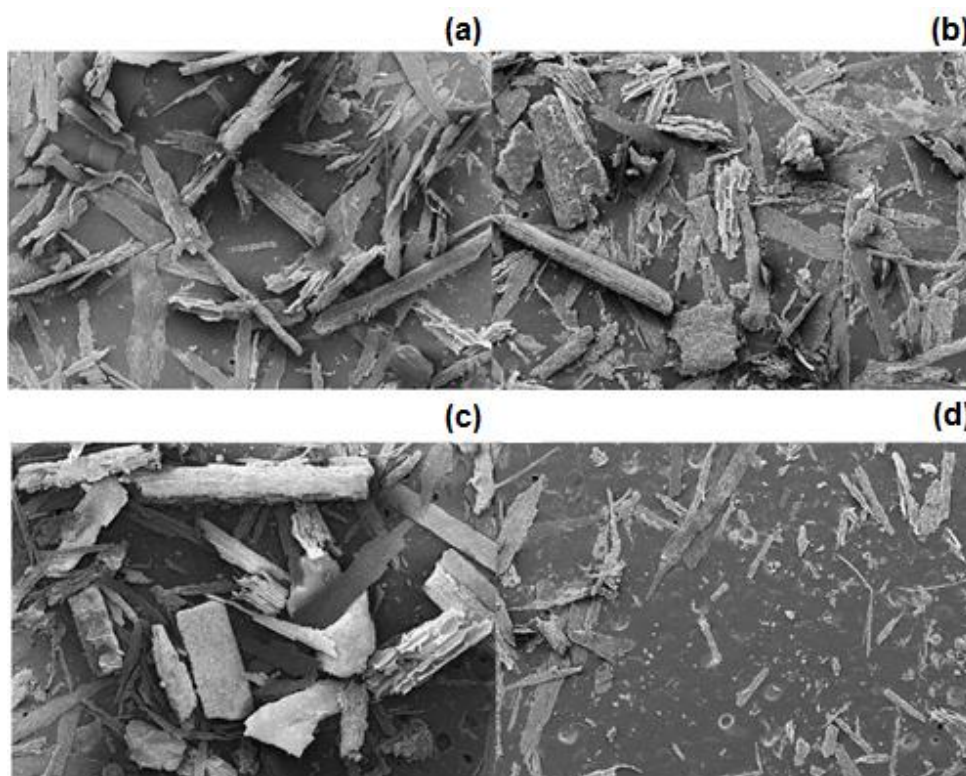


Figura 18. Captura (aumento 1000x) da casca após 0,5 h de extração com (a) hexano, (b) limoneno, (c) pineno e (d) *in natura*.

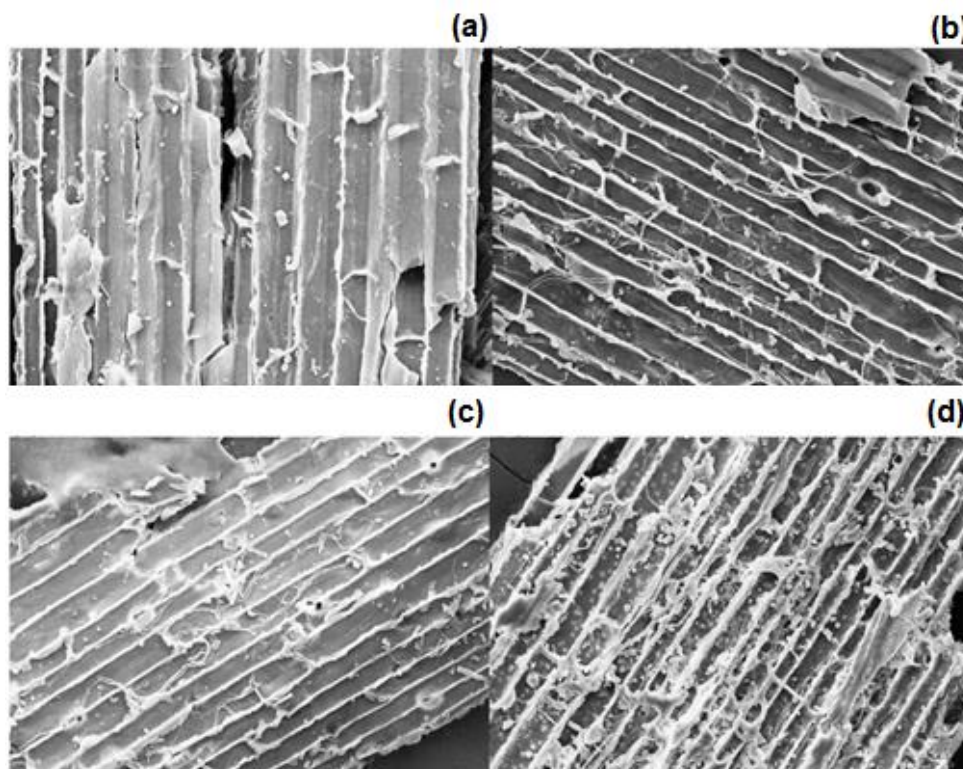


Figura 19. Captura (aumento 2500x) da casca após 0,5 h de extração com (a) hexano, (b) limoneno, (c) pineno e (d) *in natura*.

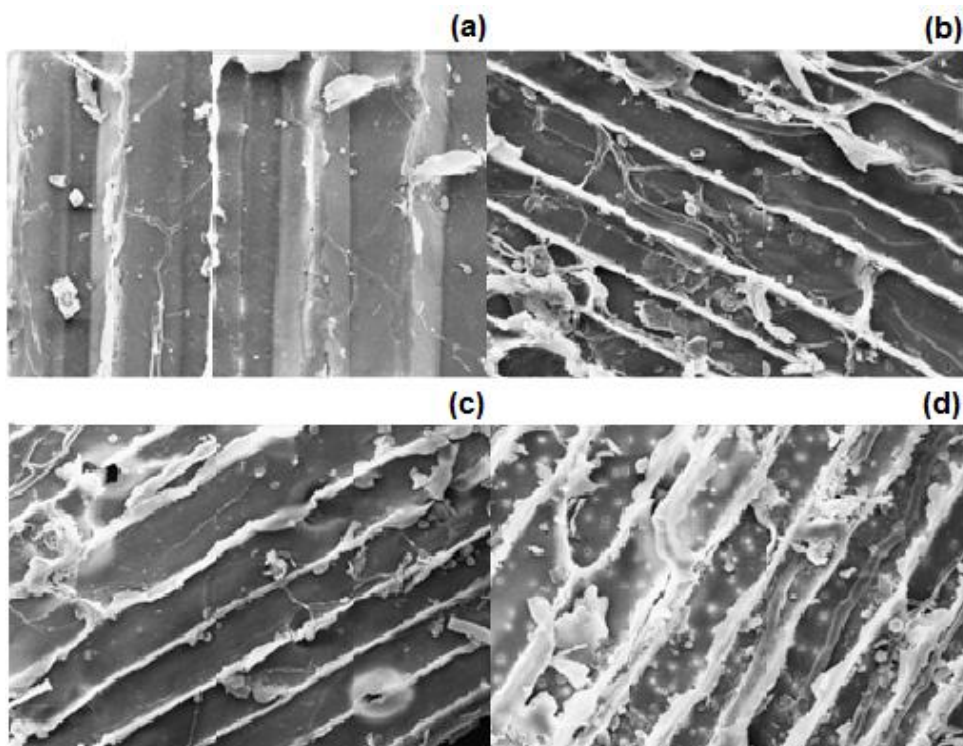
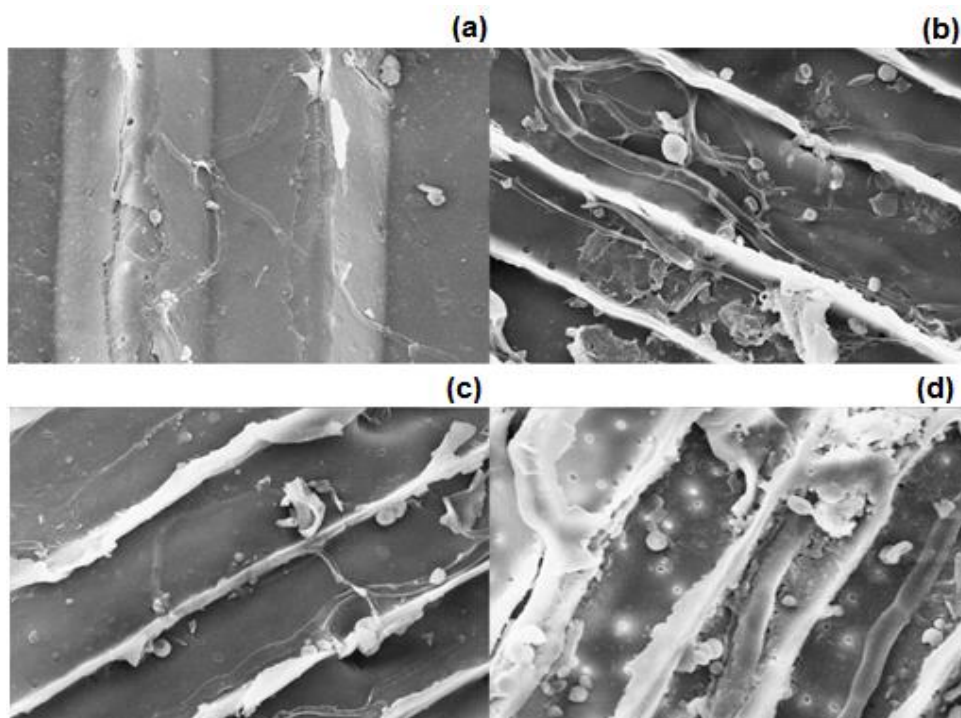


Figura 20. Captura (aumento 5000x) da casca após 0,5 h de extração com (a) hexano, (b) limoneno, (c) pineno e (d) *in natura*.



5.6. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS CERAS EXTRAÍDAS COM HEXANO, LIMONENO E PINENO

Neste item são apresentados os resultados das caracterizações químicas das ceras de cana-de-açúcar extraídas com o hexano, limoneno e pineno. As ceras foram caracterizadas quimicamente por FT-IR, GCxGC-MS/FID, índice de acidez e índice de saponificação.

5.6.1. Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

O método analítico de FT-IR foi aplicado às ceras-padrão de carnaúba e candelila (CECAR e CECAN, respectivamente) e às ceras de cana-de-açúcar extraídas com hexano (CEHEX), com limoneno (CELIM) e com pineno (CEPIN). Estas análises permitiram a identificação dos principais grupos funcionais presentes nestas ceras. As ceras-padrão, por já serem comercializadas em grande escala, foram escolhidas a fim de promover a identificação dos principais grupos funcionais existentes em ceras naturais, facilitando a identificação destes grupos nas ceras extraídas neste trabalho. Foi possível, também, comparar as ceras de cana-de-

açúcar brutas e purificadas extraídas com os terpenos e com o hexano em todos os tempos, a fim de visualizar possíveis diferenças nos espectros.

Na Tabela 13 estão representados os grupos funcionais que podem ser identificados nas ceras a partir dos espectros de infravermelho de acordo com o número de onda (cm^{-1}) das bandas que apresentam maior intensidade na transmitância.

As ceras de carnaúba e candelila são ceras comerciais já consolidadas no mercado e servem como padrão para a cera de interesse, proveniente da cana-de-açúcar. Como observa-se nos espectros da Figura 21, ceras possuem bandas características muito parecidas, como as frações alifáticas de cera de 2915 a 2850 cm^{-1} , os estiramentos de $\text{C}=\text{O}$ entre 1735 e 1710 cm^{-1} que podem indicar a presença de ésteres e de ácidos graxos, a presença de grupos metileno em 1463 cm^{-1} associados a dobramentos do $-\text{CH}_2$, os picos em 720 cm^{-1} que indicam a presença de cadeias longas ou muito longas nas amostras e na CECAN e CECAR a presença do estiramento assimétrico em 1160 cm^{-1} que pode estar associado ao $\text{C}-\text{O}$ presente nos ésteres. Os valores tabelados e as atribuições supracitadas podem ser aplicados a todos os espectros apresentados neste trabalho.

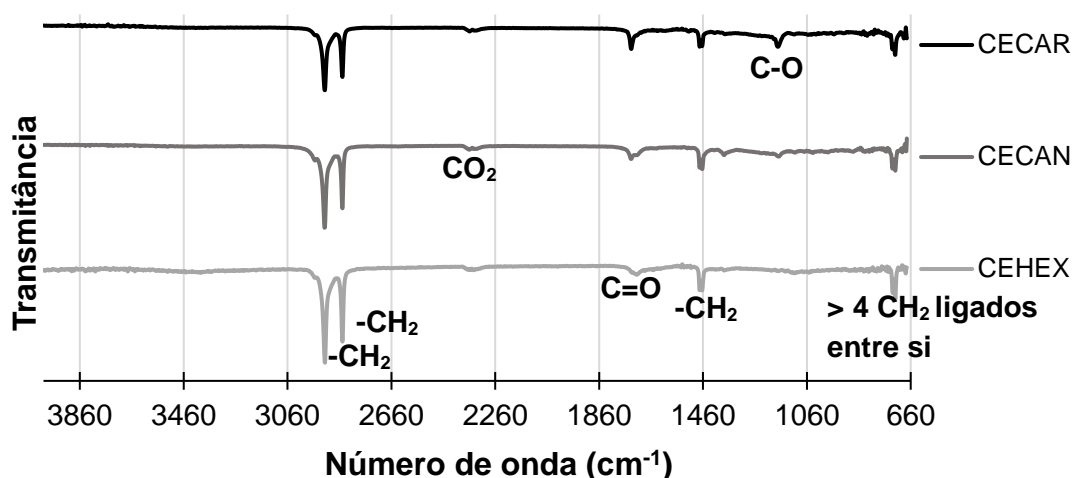
Tabela 13. Grupos funcionais do espectro pelos números de onda das bandas.

Bandas (número de onda, cm^{-1})	Grupo funcional	Associação
2920-2915	Estiramento assimétrico de $-\text{CH}_2$	Fração alifática da cera
2860-2850	Estiramento simétrico de $-\text{CH}_2$	Fração alifática da cera
2360-2320	Vibrações assimétricas de CO_2	CO_2 presente no ar
1735-1730	Estiramento de $\text{C}=\text{O}$	Presença de éster
1715-1710	Estiramento de $\text{C}=\text{O}$	Presença de grupo carbonila em ácidos graxos
1460-1465	Dobrimento de $-\text{CH}_2$	Grupos metileno
1375	Dobrimento de $-\text{CH}_3$	Grupo metila
1160	Estiramento assimétrico de $\text{C}-\text{O}$	Associado a ésteres
720	Deformação do tipo rotação que representa pelo menos 4 CH_2 ligados entre si	Cadeias longas ou muito longas

Fonte: Nielsen, 2010; Pavia et al., 2011; Qi et al., 2017.

Deste modo, verifica-se que o material obtido a partir da casca da cana-de-açúcar, utilizando hexano como solvente, exibe os mesmos grupos funcionais das ceras comerciais disponíveis no mercado, podendo também ser considerado uma cera.

Figura 21. Espectros de absorção no infravermelho obtidos das análises da cera de carnaúba (CECAR), da cera de candelila (CECAN) da cera de cana-de-açúcar purificada extraída com hexano por 0,5 h (CEHEX).



Após a confirmação da identidade do material obtido a partir da casca da cana-de-açúcar utilizando hexano e com tempo de extração de 0,5 h, verificou-se que para os demais tempos de extração as mesmas bandas características das ceras estão presentes. Os espectros para as ceras de cana-de-açúcar extraídas com diferentes tempos (brutas e purificadas) para os três solventes estão disponíveis no Apêndice A.

Na Figura 22 podem ser observados os espectros obtidos para a CEHEX, CELIM e CEPIN extraídas por 0,5 h, tanto brutas quanto purificadas. Observa-se que, diferentemente da cera extraída com o hexano, a CELIM e CEPIN apresentaram diferenças entre as bandas presentes nas ceras brutas e nas ceras purificadas, principalmente os que compõem as frações alifáticas da cera. Outra discordância é que nas ceras brutas obtidas com os terpenos estão presentes em maior intensidade as bandas em 1375 cm⁻¹ que são características de dobramento do -CH₃ de grupos do tipo metila.

Observa-se, também na Figura 22, os espectros dos resíduos provenientes do processo de purificação. Devido aos altos valores de rendimento bruto obtidos pelas extrações com solventes terpênicos, fez-se necessário o estudo destes resíduos da purificação, a fim de avaliar os grupos funcionais presentes neste extrato.

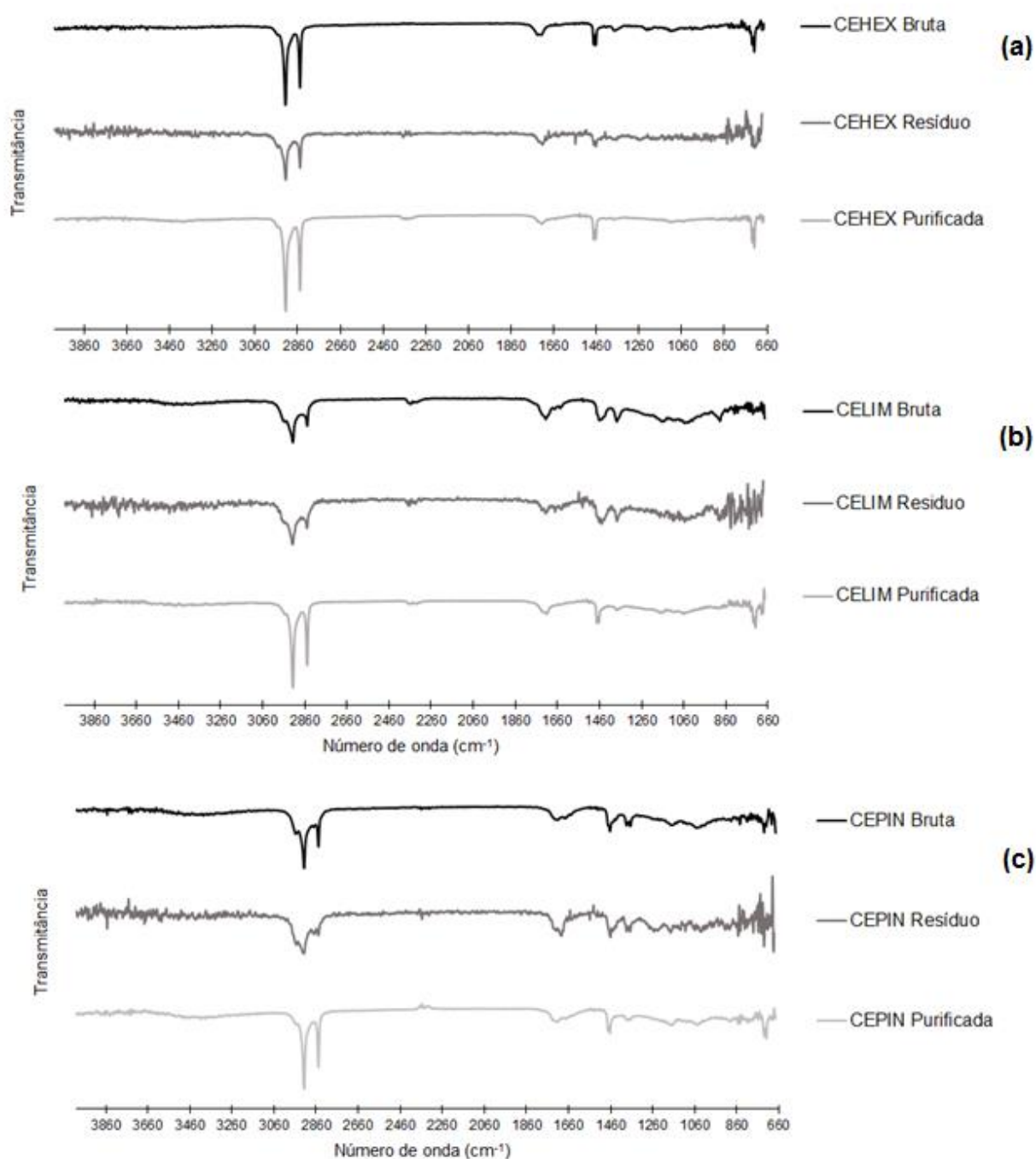
Observa-se, ainda, que os espectros das CELIM (Figura 22b) e CEPIN (Figura 22c) resíduo são muito parecidos com os espectros das CELIM e CEPIN brutas. Levando-se em consideração o baixo rendimento de cera purificada (R_{cp}) apresentado pelas ceras extraídas com os terpenos (no máximo 16 % da cera bruta), constata-se que este produto das reações indesejadas que ocorrem paralelamente ao processo extrativo influencia majoritariamente no espectro obtido para as ceras brutas. A influência das impurezas no espectro das ceras brutas também pode ser observada para a CEHEX, pois a intensidade das bandas no resíduo é menor que os da cera purificada, o que faz com que a intensidade das bandas na cera bruta seja diminuída.

Portanto, através destes espectros, foi possível observar que o resíduo da purificação obtido para as ceras brutas extraídas com limoneno e pineno tem as mesmas bandas características que as ceras brutas, corroborando a ideia de que o resíduo é composto pelas impurezas que influenciam nos altos valores de rendimento de cera bruta obtidos. Percebe-se também que, após a purificação, as ceras CELIM e CEPIN apresentam espectros mais similares aos da cera obtida com o hexano, mudança que não foi observada para a CEHEX purificada. Para CELIM e CEPIN purificadas é possível observar a diminuição das bandas em 1375 cm^{-1} e o surgimento das bandas em 720 cm^{-1} , representativas de cadeias longas ou muito longas, corroborando com a hipótese de oligomerização dos terpenos.

Apesar da pequena diferença na intensidade dos picos da fração alifática da cera (entre 1920 e 1850 cm^{-1}), todas as bandas características da cera-padrão (CEHEX), que também são encontradas nas ceras estudadas por KNUUTINEN e NORRMAN (2000), GANDRA (2006), INARKAR e LELE (2012) e QI et al. (2017), estão presentes em CELIM e CEPIN. Sendo assim, constatou-se a viabilidade qualitativa da extração de cera de cana-de-açúcar com os solventes alternativos

limoneno e pineno, não havendo distinções, em termos de grupos funcionais, relacionadas com o tempo de extração.

Figura 22. Espectros de absorção no infravermelho obtidos da (a) CEHEX, (b) CELIM e (c) CEPIN brutas e purificadas para 0,5 h de extração

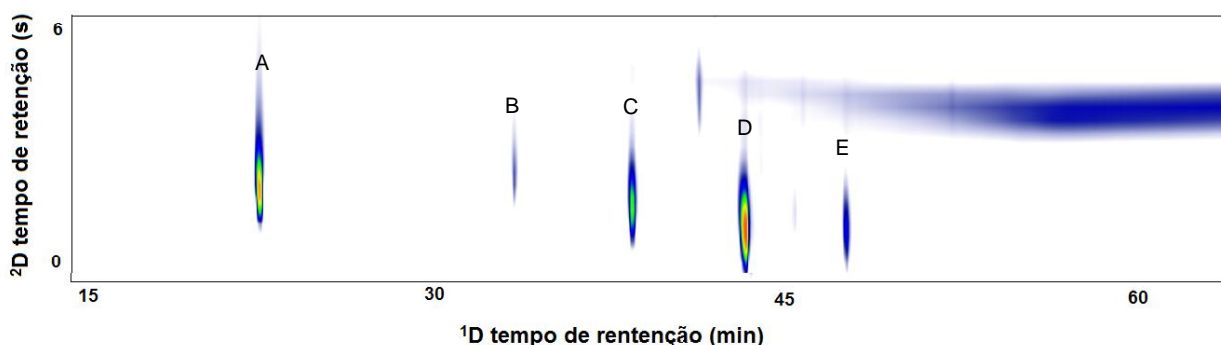


5.6.2. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente com detector por ionização de chamas/espectrometria de massas (GCxGC-FID/MS)

As amostras de cera de cana-de-açúcar foram caracterizadas por cromatografia gasosa bidimensional para identificação dos principais compostos presentes nas ceras e para quantificação do octacosanol presente nas mesmas.

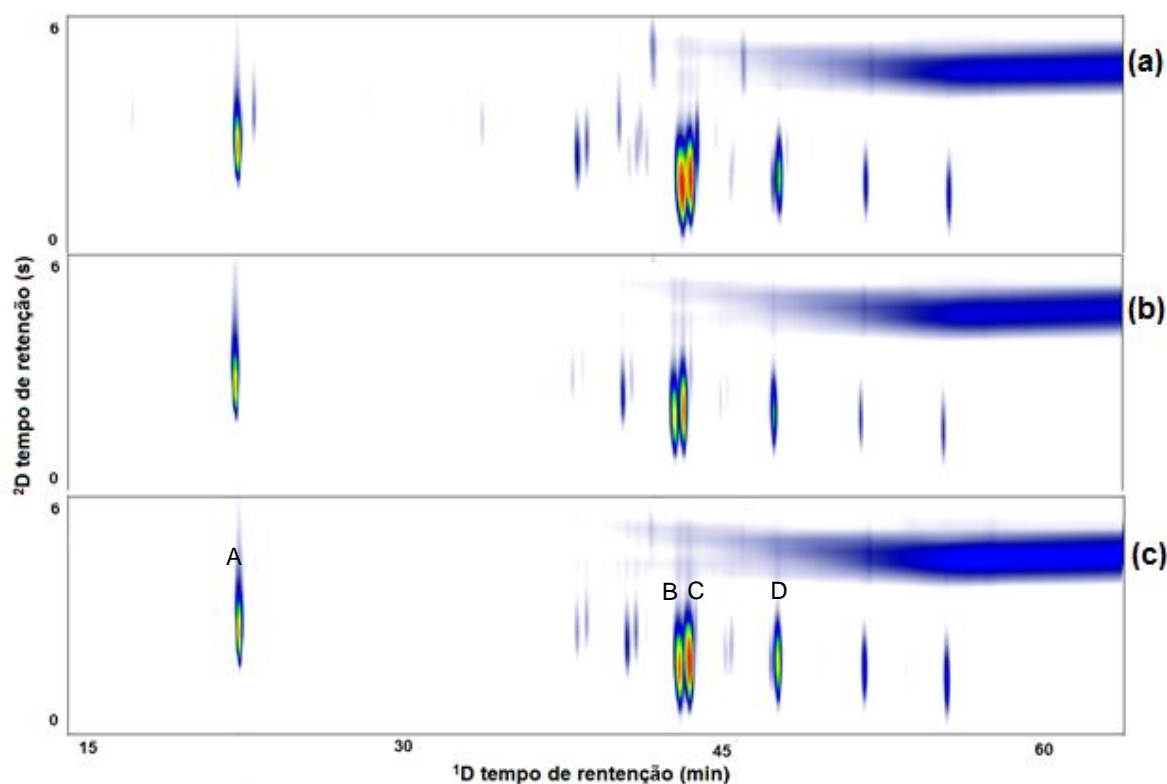
Para identificação dos principais álcoois graxos presentes nas ceras utilizou-se o Lesstanol 60 como padrão de álcoois graxos. Este padrão é uma mistura de álcoois graxos entre 24 e 30 carbonos, sendo o octacosanol e o triacontanol os álcoois mais abundantes (aproximadamente 60 e 20 %, respectivamente), como observa-se na Figura 23. Conhecendo-se o tempo de retenção (¹D) de cada álcool, pode-se identificá-los nas amostras.

Figura 23. Cromatograma dos padrões de álcoois graxos Lesstanol 60, em que: A: padrão interno eicosanol (C20:0); B: tetracosanol (C24:0); C: hexacosanol (C26:0); D: octacosanol (C28:0) e E: triacontanol (C30:0).



Os cromatogramas das ceras extraídas com hexano, limoneno e pineno por 0,5 h estão dispostos na Figura 24 em duas dimensões, enquanto na Figura 25 são observados os cromatogramas em três dimensões, representativos das ceras extraídas com (a) hexano, (b) limoneno e (c) pineno. As amostras de cera de cana-de-açúcar analisadas apresentaram álcoois graxos entre 26 e 30 carbonos, sendo que o octacosanol é o álcool em maior quantidade. É possível observar que ao lado do *blob* do octacosanol está presente em todas as amostras outro composto com alta intensidade e com tempo de retenção parecido. Este composto foi identificado através de seu espectro de massas como o ácido graxo com 28 carbonos, ácido octacosanoico (Figura 26a). Também através do espectro de massas foi possível identificar que o composto com tempo de retenção de 48,7 min é o ácido triacontanoico, que possui 30 carbonos (Figura 26b).

Figura 24. Cromatogramas GC×GC obtidos para as ceras de cana-de-açúcar extraídas por 0,5 h com (a) hexano, (b) limoneno e (c) pineno, em que: A: padrão interno eicosanol (C20:0); B: octacosanol (28:0); C: octacosanoico (C28:0) e D: triacontanoico (C30:0).

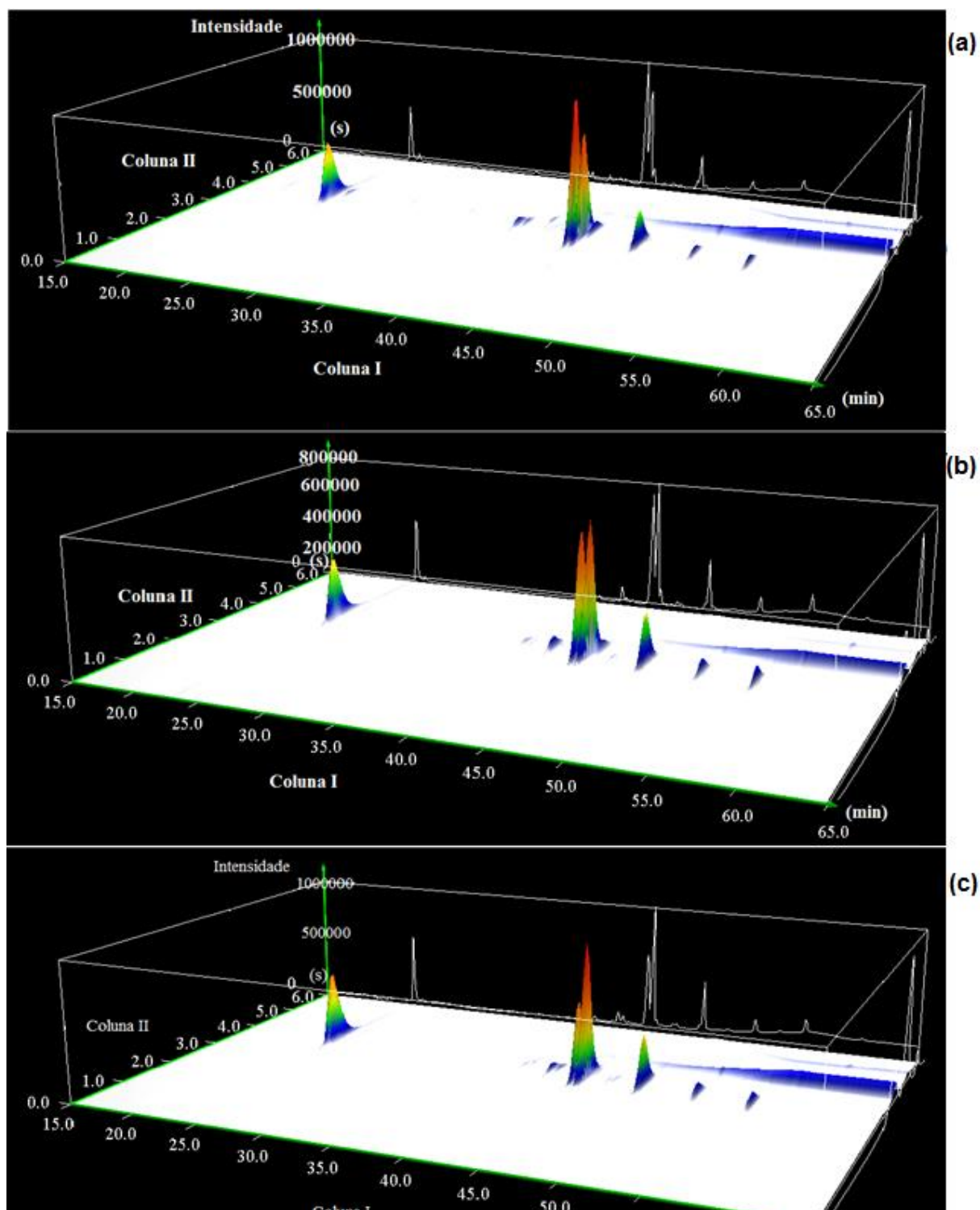


Os cromatogramas para as ceras purificadas extraídas com os terpenos apresentaram picos mais intensos para o ácido octacosanoico que para o octacosanol, comportamento que difere das ceras extraídas com o hexano, como pode-se observar mais facilmente na Figura 25. A intensidade dos picos do octacosanol e do ácido octacosanoico variam em função do solvente e do tempo utilizado na extração.

De acordo com BENNET (1956) e TULLOCH (1974), álcoois graxos entre 26 e 32 carbonos são comumente encontrados em ceras epicuticulares de várias plantas. Sendo assim, PHUKAN e BORUAH (1999), VIEIRA (2003), GANDRA (2006), LUCAS et al. (2007), WADA (2008) e PAIXÃO (2008) encontraram estes álcoois graxos na composição de suas respectivas ceras de cana-de-açúcar, sempre com o octacosanol como álcool encontrado em maior quantidade. VIEIRA (2003), GANDRA (2006), WADA (2008) e PAIXÃO (2008) também reportaram a presença de ácidos graxos com 28 e 30 carbonos, octacosanoico e triacontanoico,

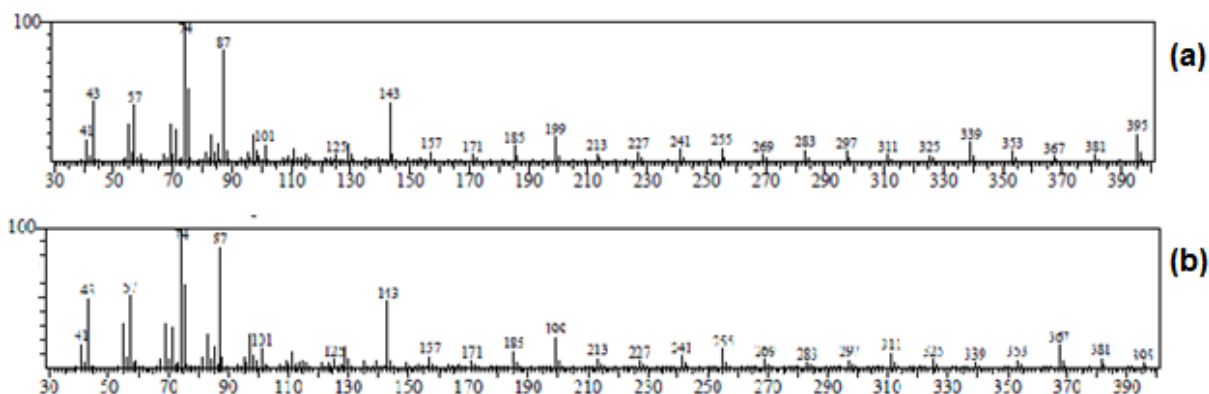
respectivamente. Pode-se observar, também, que os *blobs* referentes ao padrão interno (A) mantiveram-se semelhantes para todas as ceras, pois estavam na mesma concentração.

Figura 25. Cromatogramas GCxGC obtidos para as ceras de cana-de-açúcar extraídas por 0,5 h com (a) hexano, (b) limoneno e (c) pineno apresentados em três dimensões



Para as ceras de cana-de-açúcar extraídas com os solventes terpênicos foram encontrados compostos com mesmos tempos de retenção, porém, com intensidades diferentes.

Figura 26. Espectro de massas do (a) ácido octacosanoico e (b) ácido triacontanoico



Sendo assim, calculou-se a razão de área dos *blobs* de ácido octacosanoico e de octacosanol de acordo com a equação 7, a fim de avaliar a concentração destes componentes em função dos solventes e do tempo utilizado.

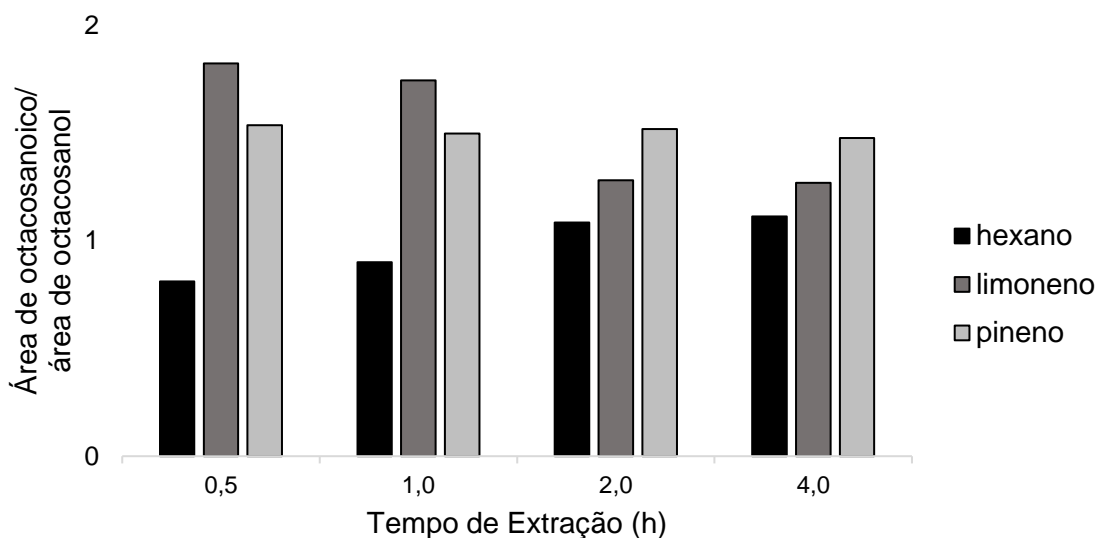
$$Razão = \frac{\text{Área do ácido octacosanoico}}{\text{Área do álcool octacosanol}} \quad (7)$$

Valores acima de 1 indicam a presença de maior quantidade de ácido octacosanoico que octacosanol.

De acordo com a Figura 27, observa-se que para 0,5 hora de extração o solvente hexano extrai mais álcool que ácido ($Razão = 0,81$), enquanto os solventes terpênicos fazem extração de mais ácido ($Razões = 1,80$ e $1,54$). Quando utilizado o solvente limoneno, o teor de octacosanol tende a aumentar frente ao octacosanoico ($Razões = 1,80$; $1,70$; $1,30$ e $1,30$). Este comportamento, porém, não é observado para o pineno, que mantém a razão praticamente estável para qualquer tempo de extração aplicado ($Razões = 1,54$; $1,50$; $1,52$ e $1,48$). Como sua razão está sempre acima de 1, é possível dizer que este solvente extrai a mesma proporção de ácido/álcool independentemente do tempo de extração aplicado. Para o limoneno esta proporção tende a diminuir com o aumento do tempo. Já o hexano, apesar de também apresentar comportamento crescente com o aumento do tempo de extração

(Razões = 0,81; 0,90; 1,08 e 1,11), manteve a sua razão mais próxima a 1, diferentemente dos solventes terpênicos.

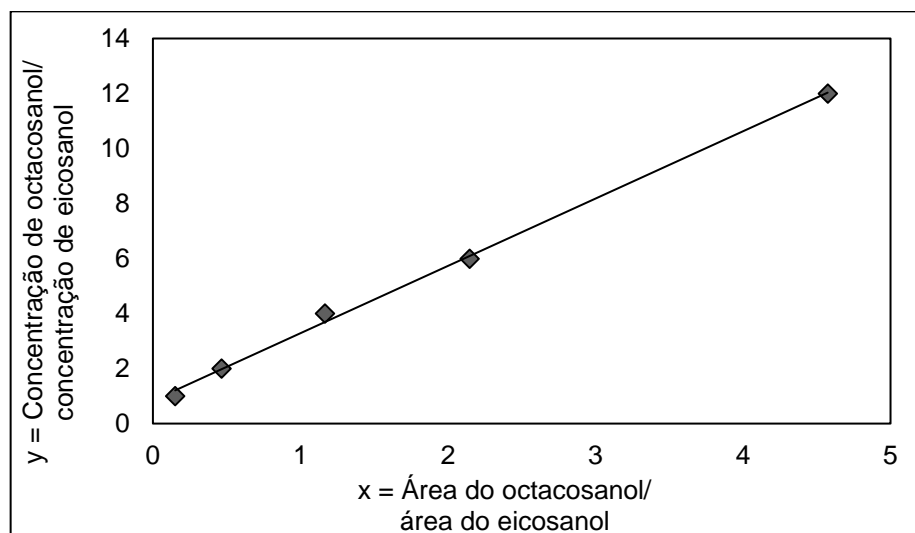
Figura 27. Razão entre área de ácido octacosanoico e octacosanol nas amostras de cera-de-açúcar



Sabe-se, portanto, que os solventes terpênicos tem maior poder de solvência para o ácido octacosanoico que o hexano, porém todos eles foram efetivos na extração do octacosanol.

Então, por se tratar do composto de interesse neste trabalho e principal constituinte do Policosanol, foi realizada a quantificação do octacosanol utilizando a curva de calibração apresentada na Figura 28.

Figura 28. Curva de calibração utilizada para quantificação de octacosanol nas amostras de cera de cana-de-açúcar. Equação: $y = 2,4472 x + 0,8385$ ($R^2 = 0,9981$)



Um modelo de regressão linear simples foi aplicado relacionando a razão entre a área do *blob* de octacosanol (C28:0) em diferentes concentrações e a área do *blob* de eicosanol (C20:0) com a razão das concentrações do octacosanol e do eicosanol. Sabendo-se que a concentração de padrão interno na cera foi fixada em 0,5 mg/mL, foi possível calcular a concentração de octacosanol por mL de solvente, expressa em mg/mL. Para isto utilizou-se a Equação 8.

$$C_{octacosanol}(\frac{mg}{ml}) = \left(2,4472 \times \left(\frac{\text{área octacosanol}}{\text{área eicosanol}} \right) + 0,8385 \right) \times 0,5 \quad (8)$$

Foram utilizados aproximadamente 10 mg de cera purificada por mL de solvente, portanto, a razão entre a concentração de octacosanol ($C_{octacosanol}$) e a concentração de cera purificada ($C_{cera\ purificada}$) da origem ao teor de octacosanol presente na cera purificada, como mostra a Equação 9.

$$Teor\ de\ octacosanol\ (\%) = \frac{C_{octacosanol} \times 100}{C_{cera\ purificada}} \quad (9)$$

Na Tabela 14 estão apresentadas os teores de octacosanol obtidos para as ceras purificadas extraídas com todos os solventes (hexano, limoneno e pineno) nos 4 tempos estudados.

Tabela 14. Teor de octacosanol nas amostras de cera purificada

Solvente	Hexano	Limoneno	Pineno
Tempo de extração (h)	Teor octacosanol (%)	Teor octacosanol (%)	Teor octacosanol (%)
0,5	31,3	17,8	18,8
1,0	28,1	19,2	19,2
2,0	23,8	22,9	18,1
4,0	22,2	27,8	21,1

Observa-se que para a cera extraída com o hexano o teor de octacosanol apresenta comportamento decrescente com o aumento do tempo de extração. Portanto, é possível concluir que para o hexano, nas condições de extração escolhidas, a maior parte do octacosanol presente na casca de cana-de-açúcar é extraído na primeira meia hora de extração. A utilização de maiores tempos de

extração provavelmente favorece a extração de outros compostos que acabam diluindo o octacosanol inicialmente extraído. Este comportamento, porém, não é observado nas extrações utilizando os solventes terpênicos, já que, com a utilização do limoneno, o teor de octacosanol aumenta com o aumento do tempo de extração e com a utilização do pineno o teor de octacosanol praticamente não se altera com o tempo de extração. Mesmo assim, é possível observar que os teores obtidos com os solventes terpênicos se aproximam dos teores obtidos com o hexano.

WADA (2008) e PAIXÃO (2008) encontraram valores de 30,5 % de álcoois graxos totais para cera de cana clarificada e purificada enquanto VIEIRA (2003), GANDRA (2006) e ROZÁRIO (2006), que utilizaram o método de derivatização com reagente de Grignard, encontraram teores de 28,3 %, 39,1 % e 29,9 %, respectivamente, sendo que Vieira obteve valores entre 56,1 e 57,5 % de octacosanol. NUISSIER et al. (2002) extraíram cera da cana utilizando ciclohexano e obtiveram resultados de 32 % de álcoois totais na cera, sendo que cerca de 68 % destes é o octacosanol. ASIKIN et al. (2012) reportaram que a cera da casca da cana-de-açúcar possui entre 31 e 39 % de álcoois graxos. Sendo assim, levando em consideração que as ceras de cana-de-açúcar possuem cerca de 30 % de álcoois totais e que cerca de 60-70 % é composto por octacosanol, os resultados obtidos para a cera de cana-de-açúcar extraída com hexano estão de acordo com os reportados na literatura. A menor concentração de octacosanol obtida para os solventes terpênicos, ainda assim, não é fator que atrapalha a aplicabilidade destes solventes nesta extração devido à não toxicidade dos mesmos, fator muito importante já que o produto de interesse é utilizado como suplemento alimentar.

5.6.3. Índices de acidez e saponificação

Dando continuidade à caracterização das ceras, determinou-se o índice de acidez e índice de saponificação. O índice de acidez é o método analítico utilizado para quantificação dos ácidos graxos livres e o índice de saponificação é o método utilizado para quantificar os ácidos graxos esterificados e livres. Os índices de acidez, expressos em mg KOH/g de cera, para as ceras de cana-de-açúcar obtidas com o hexano (CEHEX), limoneno (CELM) e pineno (CEPIN) em 0,5 h de extração estão dispostos na Tabela 15.

Observa-se que as ceras extraídas com solventes terpênicos apresentam maiores teores de ácidos graxos livres (índice de acidez) e que a cera extraída com o limoneno apresentou maior índice de saponificação. Estes valores estão de acordo com os encontrados na literatura em que as ceras extraídas da torta de filtro rotativo estudadas por GARCÍA e GARCÍA (1996), VIEIRA (2003) e GANDRA (2006) possuem valores muito parecidos com o obtido neste trabalho para a cera extraída com hexano.

Tabela 15. Resultados dos índices de acidez e saponificação para as ceras de cana-de-açúcar extraídas com hexano (CEHEX), limoneno (CELIM) e pineno (CEPIN) por 0,5 h

Índice (mg KOH/ g cera)	CEHEX ± DP*	CELIM ± DP*	CEPIN ± DP*
Acidez	22,60 ± 0,57	28,15 ± 0,49	28,87 ± 0,32
Saponificação	60,91 ± 1,69	71,25 ± 1,36	61,59 ± 2,85

* Média de 3 replicatas; DP: Desvio Padrão

Como constatado previamente nas análises por cromatografia gasosa, para 0,5 h de extração, os solventes terpênicos foram mais seletivos para o ácido octacosanoico do que para octacosanol quando comparados ao hexano, portanto, isto pode explicar o valor maior de índice de acidez obtido nestas ceras e o maior valor de índice de saponificação da cera obtida com limoneno.

5.7. CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DAS AMOSTRAS EXTRAÍDAS COM HEXANO, LIMONENO E PINENO

Neste item são apresentados os resultados das análises caracterização térmica das ceras de cana-de-açúcar extraídas com o hexano, limoneno e pineno. As ceras brutas e purificadas foram caracterizadas termicamente por DSC e TGA. Foram escolhidas as ceras de 0,5 h para serem caracterizadas, pois as análises de FT-IR não apresentaram diferenças significativas das bandas nos espectros entre os tempos de extração.

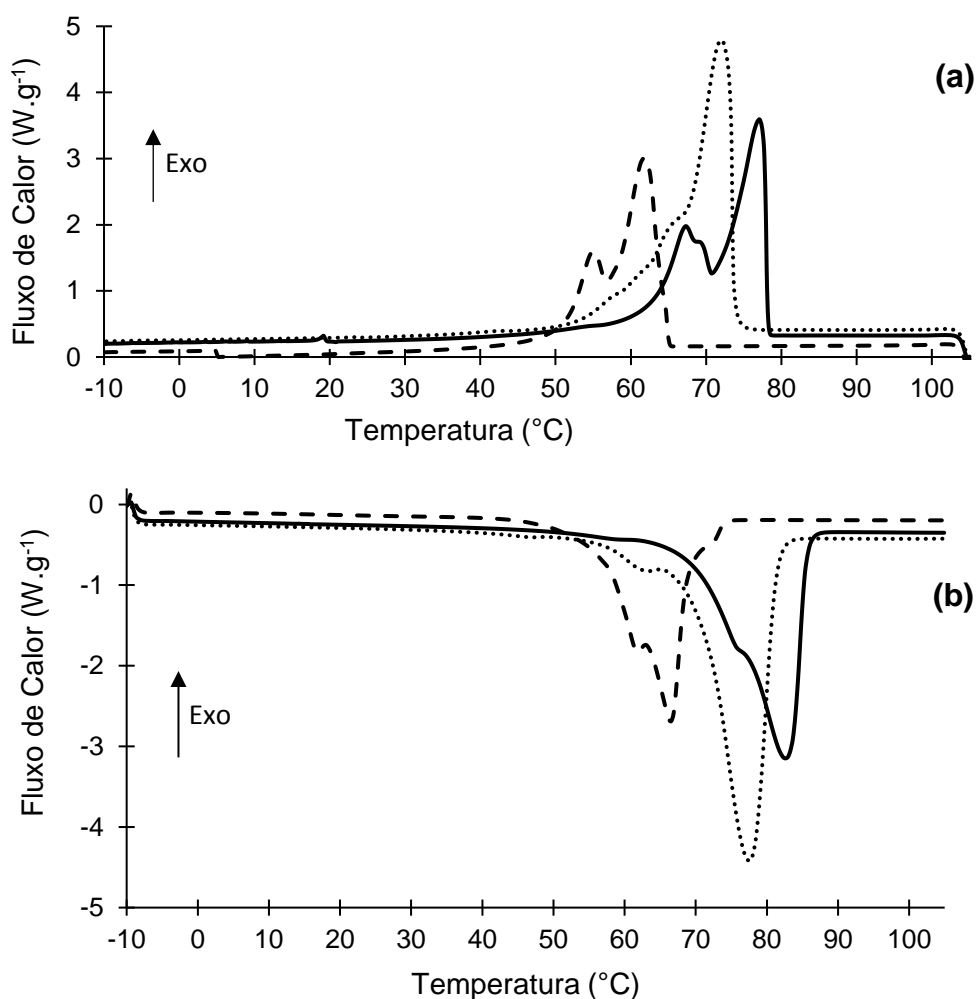
5.7.1. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises de DSC foram realizadas em amostras de ceras-padrão já consolidadas no mercado, como carnaúba (CECAR) e candelila (CECAN) e em amostras da cana-de-açúcar extraída com hexano (CEHEX), com limoneno (CELIM)

e com pineno (CEPIN). Em um termograma, a faixa de fusão da cera e o formato das curvas estão relacionados com a sua composição química e história térmica das mesmas (NASSU, 1994). Sendo assim, foram obtidos os termogramas de fusão e cristalização das ceras analisadas.

Na Figura 29 são apresentadas as curvas de fusão e cristalização para as ceras-padrão em comparação à cera purificada de cana-de-açúcar extraída por 0,5 h com hexano. Com relação à temperatura de início de fusão (T_{onset}) e temperatura máxima de fusão (T_{pico}), observou-se que a CECAN, dentre as ceras analisadas, é a que possui menor ponto de fusão. Sua $T_{onset} = 59,21\text{ }^{\circ}\text{C}$ e sua $T_{pico} = 66,50\text{ }^{\circ}\text{C}$, enquanto a CEHEX apresentou $T_{onset} = 70,62\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_{pico} = 77,55\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a CECAR apresentou $T_{onset} = 73,29\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_{pico} = 82,62\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 29. Termogramas de (a) fusão e (b) cristalização das ceras-padrão (—) CECAR, (---) CECAN e (.....) CEHEX Purificada extraída por 0,5 h



A cera de cana-de-açúcar possui ponto de fusão intermediário aos das ceras-padrão, portanto, pode-se esperar que sua aplicação como substituinte destas ceras não seja limitada pelo seu ponto de fusão. Observa-se que devido à grande quantidade de compostos presentes na cera são obtidos picos largos e que se sobrepõem, principalmente nas CECAN e CECAR.

Pode-se observar, também, que as curvas de cristalização tem comportamento similar ao das curvas de fusão. A T_{onset} de cristalização da CECAN, CECAR e CEHEX são, respectivamente, 64,70 °C, 78,32 °C e 73,87 °C, enquanto as T_{pico} são 61,82 °C, 77,11 °C e 71,99 °C.

Nas Figuras 30, 31 e 32 são mostrados os termogramas de (a) fusão e (b) cristalização em que são comparadas as ceras brutas e purificadas de CEHEX, CELIM e CEPIN. Observa-se, em todas elas, que as curvas das ceras purificadas possuem maior T_{pico} e também maior intensidade. Esta mudança nas propriedades indica que a etapa de purificação confere mais resistência térmica às ceras. As T_{onset} de fusão da CEHEX, CELIM E CEPIN brutas são 67,26 °C, 37,46 °C e 44,58 °C, enquanto as de cristalização são 70,50 °C, 50,52 °C e 58,43 °C. As T_{pico} de fusão para estas ceras brutas é 75,92 °C, 50,55 °C e 50,38 °C, já para as ceras purificadas as T_{onset} de fusão são 70,62 °C, 52,97 °C e 62,48 °C e para cristalização são 73,87 °C, 77,67 °C e 72,07 °C.

Outras importantes propriedades que podem ser analisadas pelo DSC são as entalpias de fusão e cristalização, ou seja, as energias absorvidas ou liberadas durante esses processos. Na Tabela 16 estão os resultados obtidos pelas análises de DSC (temperaturas de fusão e cristalização e entalpias de fusão e cristalização), facilitando a análise dos dados.

Observa-se que as entalpias apresentadas pelas ceras brutas são muito menores que as ceras purificadas, principalmente para CELIM e CEPIN. Isto se dá devido à presença de impurezas e da possível oligomerização dos solventes terpênicos, pois após a purificação as ceras passam a ser mais estáveis, com ponto de fusão, cristalização e entalpias muito mais próximas das ceras-padrão.

Tabela 16. Temperaturas e entalpias de fusão e cristalização das ceras, obtidas por DSC

Ceras	Fusão			Cristalização		
	T_{onset}	T_{pico}	Entalpia ΔH (J.g ⁻¹)	T_{onset}	T_{pico}	Entalpia ΔH (J.g ⁻¹)
CECAN	59,21	66,50	-136,93	64,70	61,82	127,52
CECAR	73,29	82,62	-155,40	78,32	77,11	149,98
CEHEX bruta	67,26	75,92	-129,82	70,50	69,09	162,78
CELIM bruta	37,46	50,55	-17,61	50,52	47,28	34,31
CEPIN bruta	44,58	50,38	-46,30	58,43	46,61	40,07
CEHEX purificada	70,62	77,55	-171,05	73,87	71,99	210,50
CELIM purificada	52,97	76,96	-116,08	77,67	69,49	117,28
CEPIN purificada	62,48	71,89	-79,79	72,07	67,29	84,82

Figura 30. Termogramas de (a) fusão e (b) cristalização das CEHEX (—) bruta e (---) purificada extraídas por 0,5 h

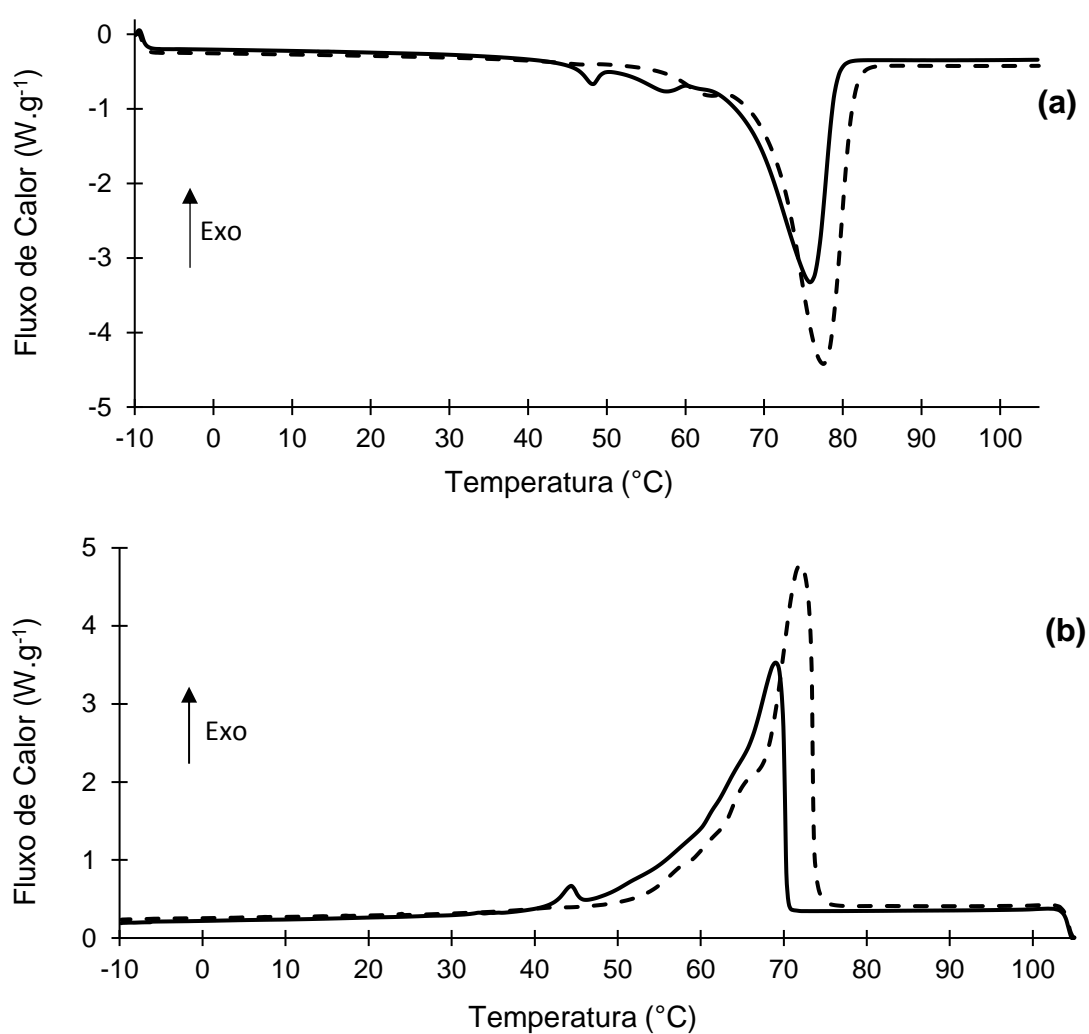


Figura 31. Termogramas de (a) fusão e (b) cristalização das CELIM (—) bruta e (---) purificada extraídas por 0,5 h

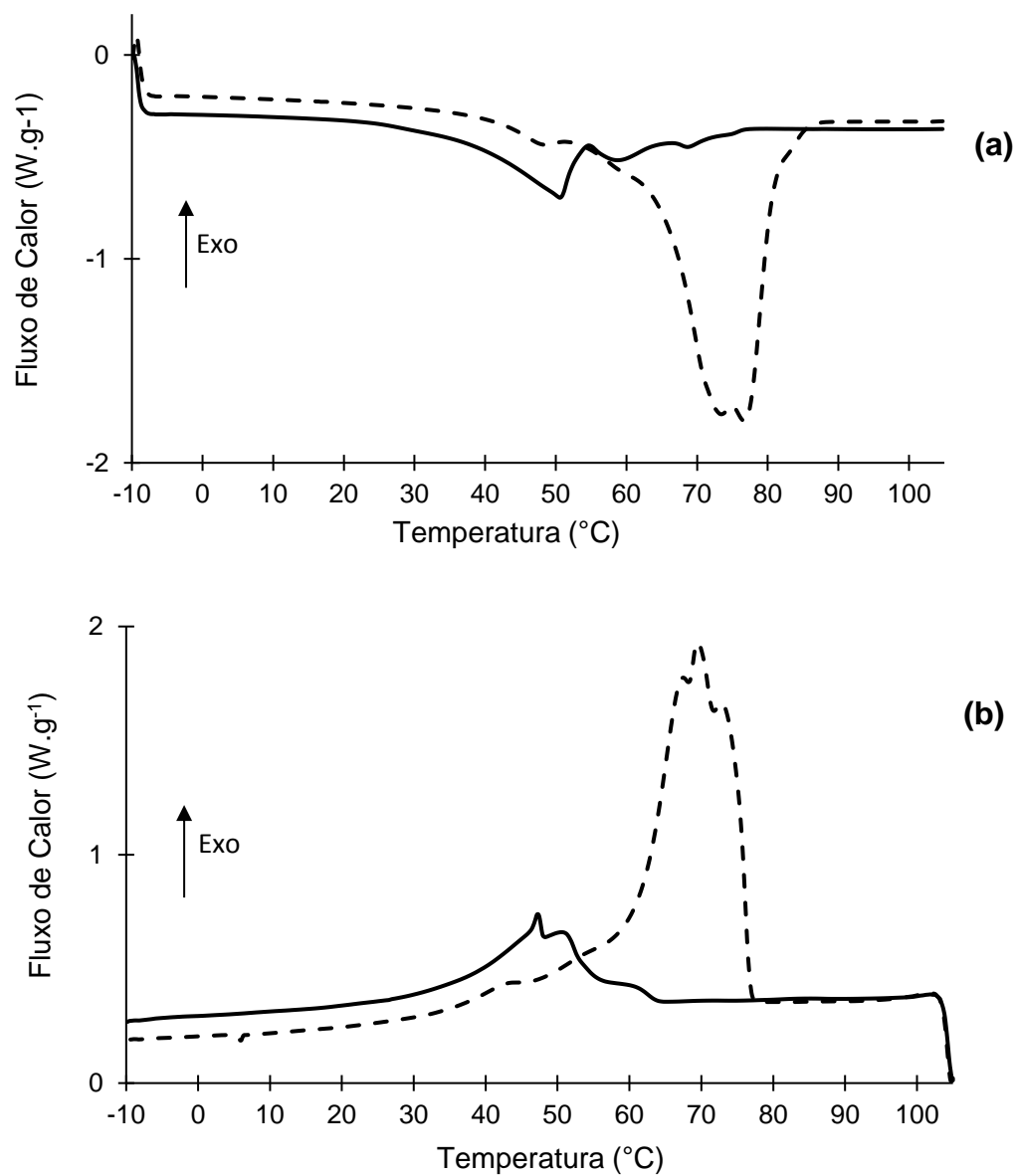
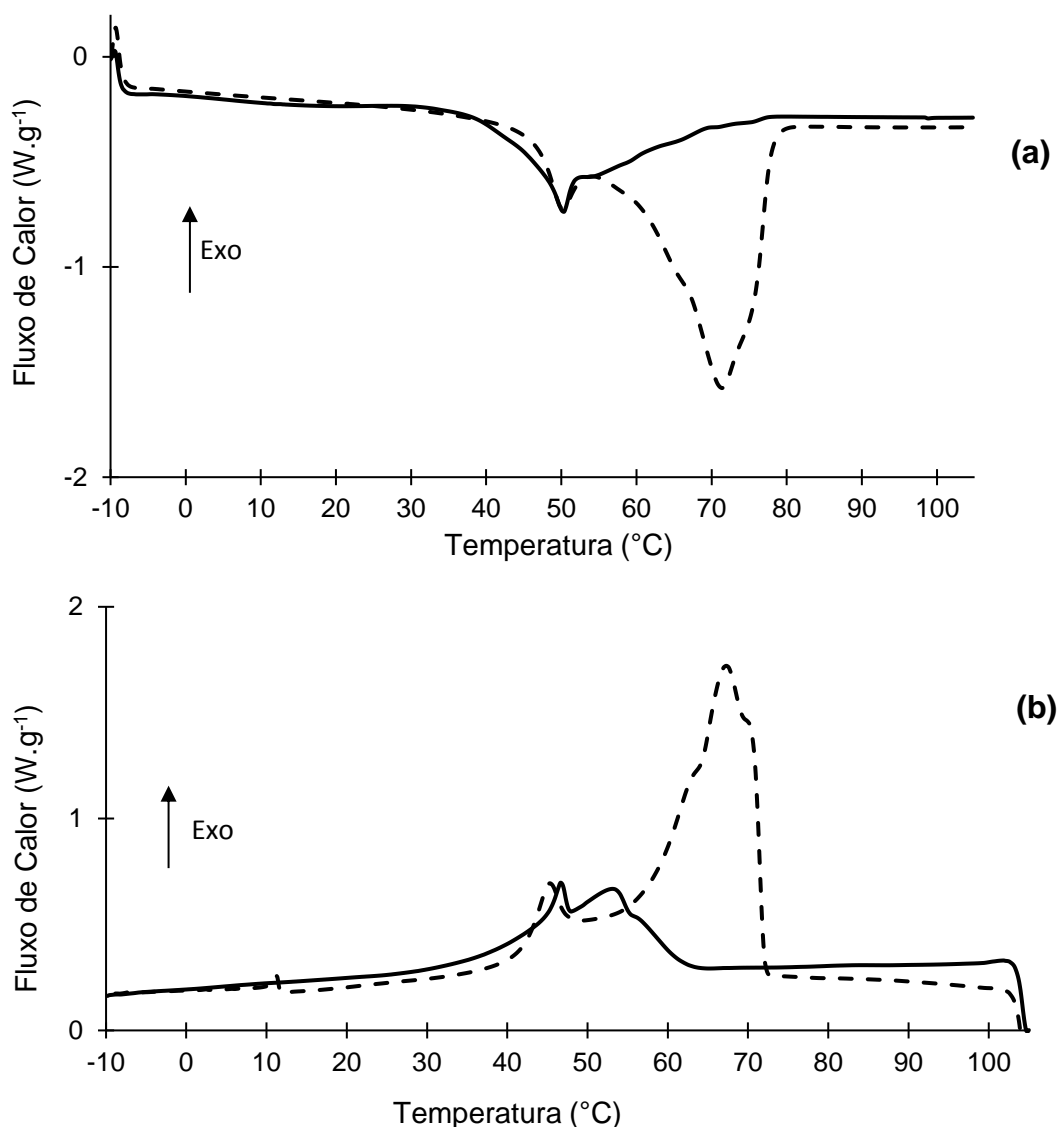


Figura 32. Termogramas de (a) fusão e (b) cristalização das CEPIN (—) bruta e (---) purificada extraídas por 0,5 h

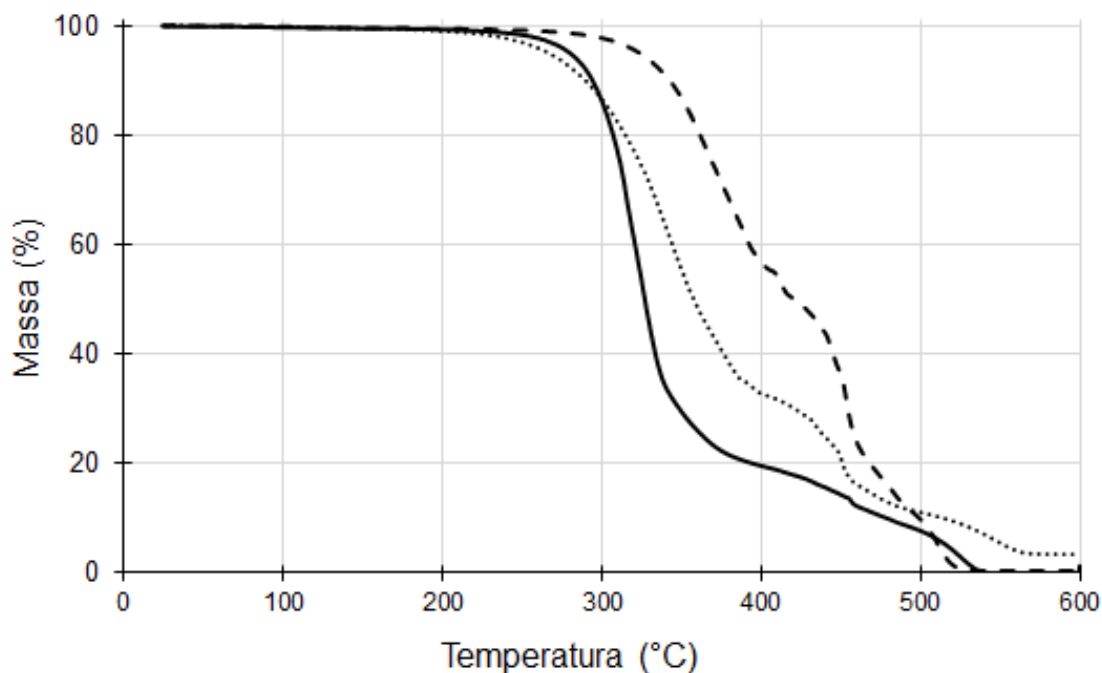


5.7.2. Análise Termogravimétrica

Na análise termogravimétrica pode-se observar o comportamento da massa do material com o aumento da temperatura sob atmosfera de ar sintético, imitando ambiente naturalmente oxidativo. Escolheu-se a faixa de temperatura de 25 a 600 $^{\circ}\text{C}$, pois é dentro desta faixa de temperatura que ocorrem a maioria das reações. Foram estudadas as ceras-padrão de carnaúba (CECAR) e candelila (CECAN) e as ceras extraídas da cana de açúcar com hexano (CEHEX), limoneno (CELIM) e pineno (CEPIN) por 0,5 h. Na Figura 33 pode-se observar que a cera-padrão mais estável termicamente é a cera de carnaúba, pois ela apresenta perda

de massa somente a partir de 260 °C. Porém, as outras ceras possuem comportamento análogo e, portanto, vê-se que o hexano é bom solvente na extração de cera de cana-de-açúcar, como constatado anteriormente.

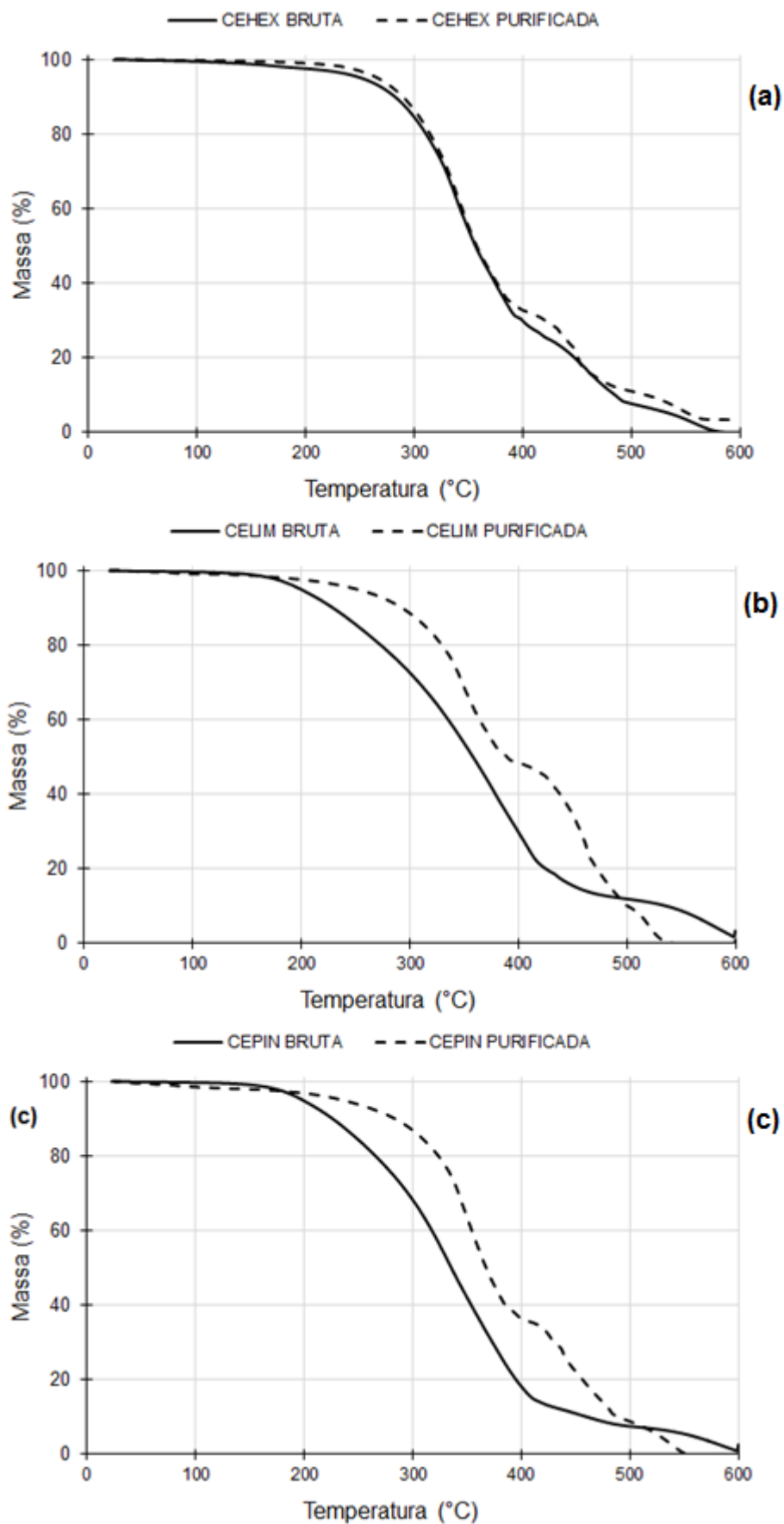
Figura 33. Termograma das ceras-padrão (—) CECAN, (- - -) CECAR e (.....) CEHEX purificada



Na Figura 34 é possível observar o comportamento análogo das ceras brutas de cana-de-açúcar. As ceras extraídas com os terpenos possuem estabilidade até a temperatura de aproximadamente 180 °C, enquanto a CEHEX permanece estável por, pelo menos, mais 20 °C.

É possível observar, também pela Figura 34, que o comportamento das ceras de cana-de-açúcar purificadas. A CEHEX não apresentou mudança significativa de comportamento, enquanto a CELIM se mostrou muito mais estável termicamente após a purificação, começando a se decompor somente após os 200 °C, tornando sua aplicabilidade muito mais ampla e segura. O mesmo pode ser observado para a CEPIN.

Figura 34. Termograma das ceras (a) CEHEX, (b) CELIM e (c) CEPIN brutas e purificadas.



6. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como principal objetivo a avaliação dos solventes terpênicos (pineno e limoneno) em substituição ao hexano na extração da cera da casca da cana-de-açúcar.

A cera extraída com o hexano apresentou resultados de rendimentos brutos e purificados dentro dos resultados esperados, porém os rendimentos das ceras brutas obtidas com os terpenos apresentaram comportamento muito divergente, sendo muito maiores para o bruto e muito menores para os purificados. Isto se deu devido à característica apresentada por estes solventes alternativos de reagirem com a temperatura e com a incidência de luz. Os rendimentos relativos, que levaram em consideração a quantidade de lipídios na biomassa, mostraram que os resultados das extrações com os solventes alternativos, principalmente com maiores tempos, são próximos aos resultados obtidos com o hexano.

Foi comprovado pelas análises químicas de FT-IR, GC×GC-FID/MS e índices de acidez e saponificação que as ceras de cana-de-açúcar purificadas extraídas com estes solventes são compatíveis com as ceras comerciais de carnaúba e candelila, já estabelecidas no mercado. Verificou-se a equiparidade térmica destas ceras, quando purificadas, pelas análises de DSC e TGA. Ainda com a cromatografia gasosa foi possível quantificar o octacosanol, principal constituinte do policosanol, nas amostras de cera extraídas com todos os tempos e solventes. Observou-se comportamento decrescente nas ceras de cana-de-açúcar extraídas com o hexano conforme o tempo de extração aumentava, indicando que com 0,5 h de extração já se obtém a totalidade deste composto nas condições de processo estudadas, variando entre 22,2 e 31,3 %. Já as ceras extraídas com os terpenos apresentaram rendimento de octacosanol variando entre 17,8 e 27,8 %.

Apesar da menor quantidade de octacosanol extraída pelos terpenos, maiores gastos energéticos e de tempo, a utilização destes solventes no processo de extração da cera da casca da cana-de-açúcar ainda é justificável, pois são solventes não-tóxicos, abundantes e, principalmente, de fontes renováveis, o que traz maior segurança do ponto de vista ambiental e de saúde dos trabalhadores.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar a extração da cera de cana-de-açúcar com o α -pineno e β -pineno isolados, para verificar se há diferença nos rendimentos e nas propriedades físico-químicas da cera extraída;
- Estudos alternativos para diminuir os tempos de extração da cera de cana-de-açúcar com o limoneno, como a utilização de misturas binárias com outros solventes;
- Estudo da separação dos principais compostos obtidos com os terpenos, o octacosanol e o ácido octacosanoico, a fim de comercializá-los ou aplicá-los em processos químicos já existentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMAN, C.L., MAS, R., HERNANDEZ, C., RODIERO, I., CEREJIDO, E., NOA, M., CAPOTE, A., MENENDEZ, R., AMOR, A., FRAGA, V., SOTOLONGO, V. AND JIMENEZ, S.: A 12-month study of policosanol oral toxicity in Sprague Dawley rats. *Toxicology Letters*, p. 77-87, 1994.

AISSOU, M.; CHEMAT-DJENNI, Z.; YARA-VARÓN, E.; FABIANO-TIXIER, A. S.; CHEMAT, F.: Limonene as an agro-chemical building block for the synthesis and extraction of bioactive compounds. *Comptes Rendus Chimie*, p. 1-13, 2016.

ASIKIN, Y.; CHINEN, T.; TAKARA, K.; WADA, K.: Determination of Long-chain Alcohol and Aldehyde Contents in the Non-Centrifuged Cane Sugar Kokuto. *Food Science and Technology Research*, v. 14, n. 6, p. 583-588, 2008.

ATTARD, T. M.; McEUROY, C. R.; REZENDE, C. A.; POLIKARPOV, I.; CLARK, J. H.; HUNT, A. J.: Sugarcane waste as a valuable source of lipophilic molecules. *Industrial Crops e Products*. v. 76, p. 95-103, 2015a.

ATTARD, T. M.; THEEUWES, E.; GOMEZ, L. D.; JOHANSSON, E.; DIMITRIOU, I.; WRIGHT, P. C.; CLARK, J. H.; MCQUEEN-MASON, S. J.; HUNT, A. J.: Supercritical extraction as an effective first-step in a maize stover biorefinery. *Royal Society of Chemistry Advances*, v. 5, p. 43831-43838, 2015b.

ATTARD, T. M.; BAINIER, C.; REINAUD, M.; LANOT, A.; MCQUEEN-MASON, J. S., HUNT, A. J.: Utilisation of supercritical fluids for the effective extraction of waxes and Cannabidiol (CBD) from hemp wastes. *Industrial Crops e Products*, v. 112, p. 38-46, 2018.

ATHUKORALA, Y.; MAZZA, G.; OOMAH, B. D.: Extraction, purification and characterization of wax from flax (*Linum usitatissimum*) straw. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 111, n. 7, p. 705-714, 2009.

BENNET, H. *Commercial Waxes*. 2 ed. New York: Chemical Publishing, 1956, 688p.

BERTOUCHE, S.; TOMAO, V.; HELLAL, A.; BOUTEKEDJIRET, C.; CHEMAT, F. First approach on edible oil determination in oilseeds products using alpha-pinene. *The Journal of Essential Oil Research*, v. 25, n. 6, p. 439-443, 2013.

BHOSALE, P.R; CHONDE, G. S.; RAULT, P.D.: Studies on extraction of sugarcane wax from press mud of sugar factories from Kolhapur district, Maharashtra. *Journal of Environmental Research and Development*, v. 6, n. 3A, p. 715-720, 2012.

BIRCH, R.G.: Metabolic Engineering in Sugarcane: Assisting the Transition to a Bio-based Economy. *Applications of Plant Metabolic Engineering*, p. 249–281, 2007.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, n. 8, 1959.

BONON, A. J.: Síntese de polímeros derivados de epóxidos de limoneno para aplicações na área médica. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2016. 229 p. Tese (doutorado).

BOUTEKEDJIRET, C.; VIAN, M. A.; CHEMAT, F.: Alternative Solvents for Natural Products Extraction. Cap. 9: Terpenes as Green Solvents for Natural Products Extraction. Eds. Farid Chemat e Maryline Abert Vian, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014, 315 p.

CARMO, M. M. H. S.: cromatografia em fase gasosa dos componentes da essência de terebentina. *Revista Portuguesa de Química*, v. 13, p. 163-167, 1971.

CHEMAT S., TOMAO V., CHEMAT F. Green Solvents I: Properties and Applications in Chemistry. Cap. 5: Limonene as Green Solvent for Extraction of Natural Products. Eds. A. Mohammad e Inamuddin, Springer Science + Business Media, 2012a.

CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G.: Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles (review). *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, p. 8615-8627, 2012b.

CHRISTIE, W. W.: Waxes. The LipidWeb, 2017. Disponível em: <<http://www.lipidhome.co.uk/lipids/simple/waxes/index.htm>>. Acesso em: 22 novembro 2017. Atualizado em 2 novembro 2017.

CIRIMINNA, R.; LOMELI-RODRIGUEZ, M; CARÀ, P. D.; LOPEZ-SANCHEZ, J. A.; PAGLIARO, M. Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy. *Chem. Commun.*, v. 50, p. 15288-15296, 2014.

COTTOM, W. P.: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 4 ed., v. 25, Waxes, 1994.

CREMASCO, M. A.: *Operações Unitárias em Sistemas Particulados e Fluidomecânicos*, 2ª Ed, Editora Blucher, 2012.

DESHMANE, S. S.; DEV, S.: Higher Isoprenoids. 2. Triterpenoids and steroids of *Saccharum-officinarum* linn. *Tetrahedron*, v. 27, n. 6, p. 1109, 1971.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SALATINO, A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M.: Phenolic composition and antioxidant activity of culms and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) products. *Food Chemistry*, v. 125, n. 2, p. 660-664, 2011.

DURKEE, J. B. *Cleaning with solvents: Science and technology*, Elsevier, 2014, 780. p.

ENDLEIN, E.; PELEIKIS, K. H.: Natural waxes - Properties, compositions and applications. *SOFW*, v. 137, n. 4, p. 1-8, 2011.

FERREIRA, E. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, A. A.; SANTOS, J. B.; VENTRELLA, M. C.; MARQUES, A. E.; PROCÓPIO, S. O.: Composição química da cera epicutilar e caracterização da superfície foliar em genótipos de cana-de-açúcar. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 23, n. 4, p. 611-619, 2005.

FISPQ Hexano – *Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos* / Petrobras Distribuidora S. A., 2017.

GAMEZ, R., ALEMAN, C. L., MAS, R., NOA, M., RODEIRO, I., GARCIA, H., HERNANDEZ, C., MENENDEZ, R. AND AGUILAR, C.: A 6-month study on the toxicity of high doses of policosanol orally administered to Sprague-Dawley rats. *Journal of Medicinal Food*, v. 4, p. 57-65, 2001.

GANDRA, K. M. Obtenção e caracterização de cera de cana-de-açúcar e suas frações. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006. 148 p. Dissertação (mestrado).

GARCIA, A.; GARCIA, M.A. Soxhlet extraction of crude wax from sugar cane. The Journal of Tecator, v. 20, n. 1, 1996.

GEORGES, P.; SYLVESTRE, M.; RUEGGER, H.; BOURGEOIS, P. Ketosteroids and hydroxyketosteroids, minor metabolites of sugarcane wax. Steroids, v. 71, p. 647-652, 2006.

GNANARAJ, R. A.: Applications of Sugarcane Wax and its Products: A Review. International Journal of ChemTech Research, v.4, n. 2, p 705-712, 2012.

GOUNI-BERTHOLD, I.; BERTHOLD, H. K. Policosanol: Clinical pharmacology and therapeutic significance of a new lipid-lowering agent. American Heart Journal, v. 143, n. 2, 2002.

GRAILLE, J.; BAREA, B.; BARRERA-ARELLANO, D.; VIEIRA, T. M. F. S.; MAHLER, B.: Caracterização analítica da cera de cana-de-açúcar para seu uso cosmético. In: O Cirad no Brasil, relatório de atividades 2001-2002. Hainzelin Etienne (ed.). Cirad-Amis Agroalimentaire. Brasília: CIRAD, p. 78, 2003.

GUIZELINI, A. O.; COSTA, V. H. R. DA; SILVA, V. R. S. DA; DOUBEK, G.; MARTINEZ, P. F. M.: Avaliação de resíduos agroindustriais para obtenção de cera da cana-de-açúcar. In Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, XII, 2017, São Carlos – SP. Blucher Chemical Engineering Proceedings, 2017. v. 1, n. 4, p.3234-3239.

GUPTA, N.; TRIPATHI, S.; BALOMAJUMDER, C.: Characterization of pressmud: A sugar industry waste. Fuel, v. 90, p. 389-394, 2011.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Laboratory Practice, v. 22, n. 8, p. 475-476, 1973.

HARVEY, D.: Modern Analytical Chemistry. McGraw-Hill Higher Education, 2000, 705 p.

HWANG, K. S.; CUPPETT, S. L.; WELLER, C. L.; HANNA, M. A.: Properties, composition, and analysis of grain sorghum wax. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 79, n. 6, p. 521-527, 2002.

HWANG, K. S., SINGH, M., WINKLER-MOSER, J. K.; LIU, S. X.: Organogel formation of soybean oil with waxes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 89, n. 4, p. 639-647, 2012.

INARKAR, M. B.; LELE, S. S. Extraction and characterization of sugarcane peel wax. *International Scholarly Research Network (ISRN Agronomy)*, v. 2012, p. 1-6, 2012.

IRMAK, S. DUNFORD, N. T. MILLIGAN, J. Policosanol contents of beeswax, sugar cane and wheat extracts. *Food Chemistry*, v. 95, p. 312-318, 2006.

JACOMINO, A. P.; OJEDA, R. M.; KLUGE, R. A.; SCARPARE FILHO, J. A.: Conservação de goiabas tratadas com emulsões de cera de carnauba. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 25, n. 3, p. 401-405, 2003.

KNUUTINEN, U.; NORRMAN, A.: Wax analysis in conservation objects by solubility studies, FTIR and DSC. In the 15th WORLD CONFERENCE ON NONDESTRUCTIVE TESTING. Rome, Italy, 2000.

LAGUNA, A. G.; CARVAJAL, D. H.; GARCÍA, M. M.; MAGRANER, J. H.; ARRUZAZABALA, M. L. V.; MÁZ, R. F.: Policonasol, una mezcla de alcoholes alifáticos primarios superiores para el tratamiento de complicaciones ateroescleróticas tales como la hiperagregabilidad plaquetaria, los accidentes isquémicos, trombosis e incluso su efectividad contra úlceras gástricas químicamente inducidas y su proceso de obtención de la caña. *Patente Cubana CU 22229A1*, 1996.

LI, S.; PARISH, E. J. In: AKOH, C.; MIN, D. B. *Food Lipids - Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker, 1998. Cap. 4: The chemistry of waxes and sterols, p. 89-114.

LI Z., SMITH K. H., STEVENS G. W., The use of environmentally sustainable bio-derived solvents in solvent extraction applications - a review. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v. 24, p. 215-220, 2016.

LIM, S. M.; YOO, J. A.; LEE, E. Y.; CHO, K. H.: Enhancement of high-density lipoprotein cholesterol functions by encapsulation of policosanols exerts anti senescence and tissue regeneration effects via improvement of anti-glycation, anti-apoptosis, and cholesteryl ester transfer inhibition. *Rejuvenation Research*, v. 19, n. 1, 2016.

LIU, S. X.; MAMIDIPALLY, P. K.: Quality comparison of rice bran oil extracted with d-limonene and hexane. *American Association of Cereal Chemists*, v. 82, n. 2, 2005.

LOPES, J. D. Processo simplificado para a produção de concentrado de ácidos graxos de cadeia longa (D-003) a partir da cera de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2010. 138 p. Dissertação (mestrado).

LUCAS, A.; GARCÍA, A.; ALVAREZ, A.; GRACIA, I.: Supercritical extraction of long chain n-alcohols from sugar cane crude wax. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 41, p. 267-271, 2007.

MAJEED, M.; GANGADHARAN, G. K.; PRAKASH, S.: Compositions and methods containing high purity fatty alcohol C24 to C36 for cosmetic applications. Google Patents. 2007.

MAMIDIPALLY, P. K.; LIU, S. X. First Approach on rice bran oil extraction using limonene. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.106, n. 2, p. 122-125, 2004.

MARINANGELI, C.P.F.; JONES, P. J. H.; KASSIS, A.N.; ESKIN, M. N. A.: Policosanols as nutraceuticals: fact or fiction (Critical Review). *Food Science and Nutrition*, v. 50, p. 259-267, 2010.

MOITY, L.; DURAND, M.; BENAZZOUZ, A.; MOLINIER, V.; AUDRY, J. M.: Alternative Solvents for Natural Products Extraction, Cap. 1: In Silico Search for

Alternative Green Solvents. Eds. Farid Chemat e Maryline Albert Vian, Springer, 2014.

MOYLER, D.: Terpeneless and sesquiterpeneless oils, Cap. 16: Citrus: The genus citrus, edited by Giovanni Dugo e Angelo Di Giacomo, CRC Press, 2002.

NAZATO, C.; TORRES, N. H.; FERRAZ, S. C. U.; VILCA, F. Z.; SILVA, D. F. S.; AGUIAR, C. L.; HARDER, M. N. C.: Employment of Wax Sugarcane (*Saccharum Officinarum*) in Formulation of a Lip Gloss by Simple Extraction and Bioethanol. *American Journal of Biochemistry*, v. 2, n. 5, 89-93, 2012.

NASSU, R. T. Estudo do comportamento térmico de óleos e gorduras por calorimetria de varredura diferencial (DSC). Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1994. 93p. Dissertação (Mestrado).

NIELSEN, S. S.: Food Analysis. Cap. 14 and 23. Springer, 4th edition, 2010.

NUISSIER, G.; BOURGEOIS, P.; GRIGNON-DUBOIS, M.; PARDON, P.; LESCURE, M. H.: Composition of sugarcane waxes in rum factory wastes. *Phytochemistry*, v. 61, p. 721-726, 2002.

NUISSIER, G.; BOURGEOIS, P.; Fahrasmane, L.; GRIGNON-DUBOIS, M.: Evaluation of vinasses from sugarcane molasses distillation as a new source of sugarcane wax. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 44, n. 5, p. 522-555, 2008.

NUNES, L. A.; CORREIA-OLIVEIRA, M. E.; SILVEIRA, T. A.; MARCHINI, L. C.; SILVA, J. W. P.: Produção de cera. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, 2012, Piracidaba – SP.

OLIGARO-BOSSO, S.; GAUDINO, E. C.; MANTEGNA, S.; GIRAUDO, E.; MEDA, C.; VIOLA, F.; CRAVOTTO, G.: Regulation of HMGCoA reductase activity by policosanol and octacosadienol, a new synthetic analogue of octacosanol. *Lipids*, v. 44, p. 907-916, 2009.

OU, S.; ZHAO, J.; WANG, Y. TIAN, YE; WANG, J.: Preparation of octacosanol from filter mud produced after sugarcane juice clarification. *LWT - Food Science and Technology*, v. 45, p. 295-298, 2012.

PAIXÃO, A. L. Obtenção de concentrado de álcoois graxos de cadeia longa a partir de cera de cana de açúcar saponificada e acidulada. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2008. 88 p. Dissertação (mestrado).

PARISH, E. J.; GRAINGER, W. S.: Food Lipids - Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, 4 ed. 2017. Cap. 4: The chemistry of waxes and sterols, p. 109-124.

PATURAU, J. M.: By-products of the Cane Sugar Industry. New York: Elsevier Publishing Company, 1989. 274 p.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R.: Introdução à espectroscopia. 4 ed., 2011. Cap. II: Espectroscopia no infravermelho, p. 15-100.

PHUKAN A. C., BORUAH, R. K. Extraction and evaluation of microcrystalline wax from press mud waste of the sugar industry. Separation and Purification Technology, v. 17, n. 3, p. 189-194, 1999.

PISO, W.: Historia Naturalis Brasiliae (1648).

QI, G.; PENG, F.; XIONG, L.; LIN, X.; HUANG, C.; LI, H.; CHEN, X.; CHEN, X.: Extraction and characterization of wax from sugarcane bagasse and the enzymatic hydrolysis of dewaxed sugarcane bagasse. Preparative biochemistry and biotechnology, v. 47, n. 3, p. 276-281, 2017.

RABELO, S. C.; COSTA, A. C.; ROSSEL, C. E. V.: Sugarcane: agricultural production, bioenergy and ethanol. 2015. Cap. 17: Industrial Waste Recovery, p. 365-381.

RIBEIRO, V. G.; ASSIS, J. S.; SILVA, F. F.; SIQUEIRA, P. P. X.; VILARONGA, C. P. P.: Armazenamento de goiabas 'paluma' sob refrigeração e em condição ambiente, com e sem tratamento com cera de carnauba. Revista Brasileira Fruticultura, v. 27, n. 2, p. 203-206, 2005.

RIOS, L. F., KLEIN, B. C., LUZ, L. F, FILHO, M. R., MACIEL M. R. W. Nitrogen Starvation for Lipid Accumulation in the Microalga Species *Desmodesmus* sp. Applied Biochemistry and Biotechnology, p. 469-476, 2015.

ROZÁRIO, C. H. R. do. Desenvolvimento de um processo para a obtenção de policosanol a partir de cera de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006. 113 p. Dissertação (mestrado).

SAUCEDO-POMPA, S.: Development of edible films from candelilla wax and antioxidants. Saltillo: Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, 2007. Tese (doutorado).

SAUCEDO-POMPA, S.; ROJAS-MOLINA, R.; AGUILERA-CARBÓ, A. F.; SAENZ-GALINDO, A.; LA GARZA, H.; JASSO-CANTÚ, D.; AGUILAR, C. N.: Edible film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado. *Food Research International*, v. 42, p. 511-515, 2009.

SCHMIDT, H.: Ullmann's Encyclopedia: Waxes. Hoechst Aktiengesellschaft, Werk Gersthofen, Augsburg, Federal Republic of Germany. Cap. 2: Recent Natural Waxes, p. 2-21, 2005.

SICAIRE, A. G.; VIAN, M.; FINE, F.; JOFFRE, F.; CARRE, P.; TOSTAIN, S.: Alternative bio-based solvents for extraction of fat and oils: Solubility prediction, global yield, extraction kinetics, chemical composition and cost of manufacturing. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, p. 8430-8453, 2015.

SLUITER, R. R., C. SCARLATA, J. SLUITER, D. TEMPLETON: Determination of Extractives in Biomass (Technical Report). National renewable energy laboratory, 2005.

SOH, L.; ECKELMAN, M. J.: Green solvents in biomass processing. *ACS Sustainable Chemistry e Engineering*, v. 4, p. 5821-5837, 2016.

SOLOMON, S.: Sugarcane By-Products Based Industries in India. *Sugar Tech*, v. 13, n. 4, p. 408-416, 2011.

STRÁNSKÝ, K., ZAREVÚCKA, M., VALTETOVÁ, I., WIMMER, Z.: Gas chromatographic retention data of wax esters. *Journal of Chromatography*, v. 1128, n. 1, p. 208-219, 2006.

TANZI, C. D.; VIAN, M. A.; GINIES, C.; ELMAATAOUI, M.; CHEMAT, F.: Terpenes as green solvents for extraction of oil from microalgae. *Molecules*, v. 17, p. 8196-8205, 2012.

TOPLISEK, T.; GUSTAFSON, R.: Cleaning with *d*-limonenes: a substitute for chlorinated solvents. *Precision Cleaning*, v. 3, p. 17-20, 1995.

TORO-VAZQUEZ, J. F.; MORALES-RUEDA, J. A.; DIBILDOX-ALVARADO, E.; CHARÓ-ALONSO, M.; ALONZO-MACIAS, M.; GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M. M.: Thermal and textural properties of organogels developed by candelilla wax in safflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 84, n. 11, p. 989-1000, 2007

TULLOCH, A. P. Composition of some natural waxes. *Cosmetic and Perfumery*, v.89, n.11, p.53-54, 1974.

VIEIRA, T. M. F. S.: Obtenção de cera de cana-de-açúcar a partir de subproduto da indústria sucro-alcooleira: Extração, Putificação e Caracterização. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003. 139 p. Tese (doutorado).

VILLAR, J.; GARCÍA, M. A.; GARCÍA, A.; MANGANELLY, E.: Crude wax extraction from filter cake in stirred tank. *Int. Sugar J.*, v. 107, n. 1277, p. 308-311, 2005.

VIROT, M.; TOMAO, V.; GINIES C.; CHEMAT, F. Total lipid extraction of food using *d*-limonene as an alternative to *n*-hexane. *Chromatographia*, v. 68, p. 311-313, 2008.

WADA, J. K. A.: Processo simplificado para obtenção de policosanol a partir de cera de cana-de-açúcar clarificada e purificada. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2008. 105 p. Dissertação (mestrado).

WANG, T.; LIU, Y. Y.; WANG, X.; YANG, N.; ZHU, H. B.; ZUO, P. P.: Protective effects of octacosanol on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats via regulation of ProNGF and NGF signaling. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 31, p. 765-774, 2010.

WEERAWATANAKORN, M.; TAMAKI, H.; ASIKIN, Y.; WADA, K.; TAKAHASHI, M.; HO, C. T.; PAN, M. H.: Policosanol contents, volatile profile and toxicity test of granulated cane sugar enriched with rice bran materials. *International Food Research Journal*, v. 24, n. 3, p. 1019-1028, 2017.

WOLFMEIER, U.: *Ullmann's Encyclopedia: Waxes*. Hoechst Aktiengesellschaft, Werk Gersthofen, Augsburg, Federal Republic of Germany, 2005. Cap. 1: Introduction, p. 38.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Agência Embrapa de Informação Tecnológica (Ageitec).

http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_1_711200516715.html

Acesso em: 11/06/2018.

Safra Brasileira de Cana-de-açúcar (Boletim Cana 1 Levantamento 18-19). Companhia Nacional de Desenvolvimento (CONAB).

<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>

Acesso em 11/06/2018.

Relatório final da safra 2017/2018 para a região Centro-Sul. União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA).

<http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=102>

Acesso em: 11/06/2018.

ANEXO I – Ésteres metílicos para óleos e gorduras

1. Definição

Ésteres metílicos (saturados e insaturados) são preparados e determinados quantitativamente por cromatografia gasosa capilar (CG capilar).

2. Aplicação

Aplicável a todos os óleos e gorduras em geral. As condições de análise não permitem a determinação de ácidos graxos oxidados ou gorduras que tenham sido polimerizadas.

3. Materiais e equipamentos

- Agitador de tubos (vórtex)
- Balança analítica
- Banho-maria
- Béquer plástico (500 mL)
- Pipeta graduada (5 ou 10 mL)
- Pipeta Pasteur de vidro (1,5 mL)
- Pipetador
- Relógio
- Suporte para tubos
- Suporte para tubos com base redonda
- Termômetro de álcool – mínimo 110 °C
- Tetina
- Tubo de ensaio com tampa
- Vial âmbar de 1,5 mL e septo, para injeção em cromatógrafo.

4. Reagentes

- Éter de petróleo P.A.
- Reagente de esterificação

Preparação do reagente de esterificação: em um balão de fundo redondo e boca esmerilhada de 1 L, adicione 20 g de cloreto de amônia em 600 mL de metanol. Acrescente 30 mL de ácido sulfúrico concentrado (com cuidado, pois a reação é violenta). Adapte o condensador ao balão e deixe essa mistura em refluxo até dissolver todo o sal (NH_4Cl) contido no fundo do balão. Este reagente é estável por várias semanas.

- Reagente de saponificação

Preparação do reagente de saponificação: em um béquer de plástico de 2 L, pese 28,5 g de hidróxido de potássio e adicione 1 L de metanol com auxílio de banho de gelo.

- Solução de cloreto de sódio (NaCl) saturada.

5. Procedimento

- Fixe a base no tubo, fora da balança para evitar a sua descalibração.
- Pese de 50 a 60 mg de amostra em tubo de ensaio com tampa.
- Adicione 4,0 mL do reagente de saponificação e tampe.
- Caso a amostra esteja solidificada, aqueça-a no banho-maria, imediatamente antes de agitar no vórtex.
- Agite no vórtex (entre 15-30 segundos)
- Aqueça o tubo de ensaio por 20 minutos em banho-maria a 90 °C, utilizando suporte para tubos.
- Resfrie o tubo de ensaio em banho de gelo até que a temperatura da tampa esteja levemente morna.
- Agite-o no vórtex até a completa dissolução (entre 15-30 segundos)
- Aqueça o tubo de ensaio por 5 minutos em banho-maria a 90 °C, utilizando suporte para tubos.
- Resfrie o tubo de ensaio em banho de gelo, utilizando béquer de 50 mL até que a temperatura da tampa esteja levemente morna.
- Adicione ao tubo 4 mL de solução de NaCl saturada.
- Adicione 5 mL de éter de petróleo.
- Tampe o tubo e agite-o no vórtex por aproximadamente 30 segundos.
- Coloque no vial 1,5 mL do sobrenadante com o auxílio de pipeta de Pasteur.

- Descarte o restante da solução no frasco de resíduo correspondente à análise.
- Tampe os vials e coloque-os no freezer até o momento da análise no cromatógrafo.

APÊNDICE A – Espectros FT-IR das ceras extraídas com hexano (CEHEX), limoneno (CELIM) e pineno (CEPIN) em diferentes tempos

